



TUGAS AKHIR - SB141510

**AKTIVITAS ENZIM LIGNINOLITIK JAMUR  
*Gliomastix* sp. dan *Mycelia sterilia* sp.  
DENGAN INDUKSI LOGAM PADA LIMBAH  
BAGASE**

**DWI WAHYU INTANI  
1511100063**

**Dosen Pembimbing  
Nengah Dwianita Kuswyasari, S.Si., M.Si.**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**



FINAL PROJECT - SB141510

**LIGNINOLYTIC ENZYME ACTIVITIES IN  
*Gliomastix* sp. AND *Mycelia sterilia* sp. BY  
METAL INDUCTION ON WASTE BAGASSE**

**DWI WAHYU INTANI  
1511100063**

**Supervisor  
Nengah Dwianita Kuswytasari, S.Si., M.Si.**

**Biology Departement  
Faculty of Mathematics and Natural Science  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### AKTIVITAS ENZIM LIGNINOLITIK JAMUR *Gliomastix* sp. DAN *Mycelia sterilia* sp. DENGAN INDUKSI LOGAM PADA LIMBAH BAGASE

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada  
Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh :

**DWI WAHYU INTANI**  
**NRP. 1511 100 063**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir :

N. D. Kuswyasari, S.Si., M.Si. .... (Pembimbing)

Surabaya, 27 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NIDN 19690907 199803 2 001

AKTIVITAS ENZIM LIGNINOLITIK JAMUR *Gliomastix* sp.  
DAN *Mycelia sterilia* sp. DENGAN INDUKSI LOGAM PADA  
LIMBAH BAGASE

**Nama Mahasiswa** : Dwi Wahyu Intani  
**NRP** : 1511 100 063  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : N. D. Kuswytasari, S.Si., M.Si.

**Abstrak**

*Bagase merupakan limbah pertanian lignoselulosa yang dapat mendukung pertumbuhan mikroba untuk menghasilkan enzim ligninolitik. Penggunaan konsorsium dan penambahan logam-logam dasar diharapkan mampu meningkatkan produksi enzim. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji pengaruh  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  dan  $\text{Mn}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik jamur *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 pada limbah bagase.*

*Penelitian ini menggunakan metode fermentasi padat.. Variabel bebas adalah variasi kultur, dan konsentrasi logam berat. Sedangkan variabel terikat adalah aktivitas enzim LiP, MnP dan lakase. Data dianalisis dengan Anova dilanjutkan dengan uji DMRT menggunakan Statistical Analysis System.*

*Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada penambahan  $\text{Cu}^{2+}$ , *Mycelia sterilia* sp. menghasilkan aktivitas enzim ligninolitik tertinggi yaitu LiP: 3433U/ml, MnP: 2237U/ml dan lakase: 1345U/ml. Pada penambahan  $\text{Zn}^{2+}$ , *Gliomastix* sp. mempunyai aktivitas tertinggi yaitu LiP: 4910U/ml, MnP: 2285U/ml dan lakase: 865U/ml. Pada penambahan  $\text{Mn}^{2+}$ , *Gliomastix* sp. juga mempunyai aktivitas enzim ligninolitik tertinggi yaitu LiP : 1130U/ml, MnP : 818U/ml, dan lakase: 1543U/ml.*

**Kata kunci** : Enzim ligninolitik, *Gliomastix* sp.2 LM1020, Logam, *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041.

LIGNINOLYTIC ENZYME ACTIVITIES IN *Gliomastix* sp.  
AND *Mycelia sterilia* sp. BY METAL INDUCTION ON  
WASTE BAGASSE

**Student Name** : Dwi Wahyu Intani  
**NRP** : 1511 100 063  
**Departement** : Biology  
**Supervisor** : N. D. Kuswytasari, S.Si., M.Si.

**Abstract.**

Bagasse is a lignocellulosic agricultural waste that can support the growth of microbes to produce ligninolytic enzymes. The Use of the consortium and the addition of base metals are expected to increase the production of enzymes. The purpose of this study was to examine the effect of  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  on the activity of ligninolytic enzymes of *Mycelia sterilia* sp. LM1041 and *Gliomastix* sp. LM1020 on bagasse waste.

This study uses bagasse solid fermentation. The independent variable is the variety of cultures, and the concentration of heavy metals. The dependent variable is the enzyme activity of LiP, MnP and laccase. Observed data analyzed by Anova, continued by DMRT test with program Statistical Analysis System.

The results showed that the addition of  $\text{Cu}^{2+}$ , single culture *Mycelia sterilia* sp. produces the highest activity, LiP at 3433U / ml, MnP 2237U / ml and laccase 1345U / ml. On the addition of  $\text{Zn}^{2+}$ , single culture *Gliomastix* sp. having the highest activity, LiP at 4910U / ml, MnP 2285U / ml and laccase 865U / ml. On the addition of  $\text{Mn}^{2+}$ , single culture *Gliomastix* sp. also had the highest activity, LiP at 1130U / ml, MnP of 818U / ml, and laccase at 1543U / ml.

**Keywords** :Ligninolytic enzyme, *Gliomastix* sp.2 LM1020, Metal, *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberi rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyusun tugas akhir dengan judul **Aktivitas Enzim Ligninolitik Jamur *Gliomastix* sp. dan *Mycelia Sterilia* sp. dengan Induksi Logam pada Limbah Bagase**. Penulisan tugas akhir ini dilakukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar kesarjanaan strata 1 (S1) pada Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

Pada penulisan tugas akhir ini, penulis mendapatkan bimbingan dan arahan dari berbagai pihak. Rasa hormat dan terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu N.D. Kuswyasari, S.Si., M.Si. selaku pembimbing tugas akhir yang telah memberikan bimbingan, arahan dan dukungan serta terima kasih penulis sampaikan kepada para dosen penguji, Ibu Dr.rer.nat.Ir.Maya Shovitri, M.Si, dan Ibu Tutik Nurhidayati, S.Si., M.Si yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat membangun. Ucapan terima kasih juga penulis sampaikan kepada orang tua tercinta, Ayah dan Ibu dan segenap keluarga atas segala kasih sayang, perhatian, bimbingan dan doa yang tiada hentinya, Serta tak lupa kepada teman-teman atas kebersamaan, semangat, dukungan, saran dan kekeluargaan yang telah diberikan.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan tugas akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan. Besar harapan penulis, tugas akhir ini dapat bermanfaat.

Surabaya, 27 Juli 2015

Dwi Wahyu Intani

## DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN.....	v
ABSTRAK .....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR TABEL .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ampas Tebu .....	7
2.2 Bahan Lignoselulosa .....	8
2.3 Lignin .....	9
2.4 Fungi Pendegradasi Lignin.....	13
2.5 <i>Gliomastix</i> sp. ....	14
2.6 <i>Mycelia sterilia</i> .....	16
2.7 Pengaruh Logam Berat dalam Degradasi lignin.....	16
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	21
3.2 Alat, Bahan, dan Cara Kerja.....	21
3.2.1 Subkultur isolat uji .....	21
3.2.2 Preparasi suspensi inokulum .....	21
3.2.3 Pembuatan medium basal- <i>chloramphenicol</i> .....	22
3.2.4 <i>Pre-treatment</i> limbah bagase.....	22
3.2.5 Pembuatan kurva pertumbuhan .....	23

3.2.6 Pembuatan starter .....	23
3.2.7 Pembuatan larutan DNS .....	24
3.2.8 Tahap optimasi produksi enzim ligninolitik .....	24
3.2.9 Uji aktivitas enzim ligninolitik .....	24
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisis Data .....	28

#### BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Kurva Pertumbuhan .....	29
4.2 Produksi Enzim .....	33
4.3 Aktivitas Enzim .....	36
4.3.1 Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim ligninolitik <i>Gliomastix</i> sp. ....	38
4.3.2 Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim ligninolitik <i>Mycelia sterilia</i> sp. ....	41
4.3.3 Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim ligninolitik konsorsium .....	45
4.3.4 Pengaruh logam terhadap aktivitas enzim ligninolitik kontrol (tanpa isolat) .....	48

#### BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan .....	51
5.2 Saran .....	52

DAFTAR PUSTAKA .....	53
LAMPIRAN .....	69



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Struktur Lignin .....	10
Gambar 2.2 Struktur Dasar Biosintesis Lignin .....	11
Gambar 2.3 Ilustrasi Molekuler Jaringan Tumbuhan dan Hubungan dengan Lignin, Hemiselulosa dan Selulosa .....	11
Gambar 2.4 <i>Gliomastix fusigera</i> .....	15
Gambar 2.5 Aktivitas MnP pada konsentrasi yang bervariasi terhadap waktu inkubasi pada pH 4.5 dan suhu 37°C.....	19
Gambar 4.1 Pertumbuhan kultur <i>Gliomastix</i> sp.2 dan <i>Mycelia sterilia</i> sp.2.....	30
Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan <i>Mycelia sterilia</i> sp.2..	31
Gambar 4.3 Kurva Pertumbuhan <i>Gliomastix</i> sp.2.....	32
Gambar 4.4 Kurva Pertumbuhan Konsorsium <i>Gliomastix</i> sp.2 dan <i>Mycelia sterilia</i> sp.2..	33
Gambar 4.5 Pertumbuhan <i>Gliomastix</i> sp. pada konsentrasi Mn.....	35
Gambar 4.6 Pertumbuhan miselium tanpa Logam.....	36
Gambar 4.7 Aktivitas Enzim Ligninolitik <i>Gliomastix</i> sp.....	38

Gambar 4.8	Aktivitas Enzim Ligninolitik <i>Mycelia sterilia</i> sp.....	42
------------	--	----

Gambar 4.9	Aktivitas Enzim Ligninolitik Konsorsium.....	46
------------	--	----

Gambar 4.10	Aktivitas Enzim Ligninolitik kontrol (tanpa isolat).....	49
-------------	--	----

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Karakteristik Bagase Tebu .....	8
Tabel 2.2 Peranan Enzim pada Degradasi Lignin dan Reaksi.....	12
Tabel 2.3 Pengaruh Konsentrasi $Zn^{2+}$ pada <i>P. chrysosporium</i> (MTCC-787).....	18
Tabel 2.4 Pengaruh Konsentrasi $Cu^{2+}$ pada <i>P. chrysosporium</i> (MTCC-787).....	18
Tabel 4.1 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik <i>Gliomastix</i> sp.....	41
Tabel 4.2 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik <i>Mycelia sterilia</i> sp.....	44
Tabel 4.3 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik Konsorsium.....	47
Tabel 4.4 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik Kontrol (tanpa isolat).....	50

				Halaman
Lampiran 1	Tabel	Biomassa	Kurva	
	Pertumbuhan.....			69
Lampiran 2	Pertumbuhan	Miselium	<i>Mycelia</i>	
	<i>sterilia</i> sp.....			70
Lampiran 3	Pertumbuhan Miselium	<i>Gliomastix</i> sp..		71
Lampiran 4	Pertumbuhan Miselium	Konsorsium ...		72
Lampiran 5	Pertumbuhan	Miselium	Kontrol	
	(Tanpa Isolat).....			73



## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Ampas tebu (Bagase) adalah limbah pertanian lignoselulosa yang dihasilkan dari industri pemurnian gula, yaitu kira-kira  $317 - 380 \times 10^6$  juta ton pertahun secara global (Sanchez, 2009). Hasil samping ampas tebu (bagase) yaitu sekitar 30 – 40% dari berat total batang tebu (Rosmeika *et al.*, 2009). Pada industri gula, setiap 10 ton tebu (*S. officinarum* L.) akan menghasilkan 3 ton bagase basah. Sebagai konsekuensinya, terjadi akumulasi tahunan bagase yang kaya karbohidrat. Produksi tebu di Indonesia pada tahun 2007 sebesar 21 juta ton dan potensi ampas yang dihasilkan yaitu sekitar 6 juta ton ampas per tahun (Ginting *et al.*, 2013). Residu pertanian yang terdiri dari polisakarida ini, dapat mendukung pertumbuhan mikroba untuk menghasilkan enzim penting dalam industri termasuk enzim ligninolitik (Yasmeen *et al.*, 2013). Pada penelitian sebelumnya, telah dilaporkan bahwa bagase merupakan medium terbaik untuk mendapatkan aktivitas enzim ligninolitik pada beberapa spesies fungi pendegradasi lignin (Ilmi, 2013).

Lignoselulosa adalah biomassa yang sangat melimpah di bumi, dengan jumlah sekitar 50% dari total karbon organik di dunia (Kuhad & Singh, 1993). Lignoselulosa dapat dijadikan sumber yang menarik untuk produksi energi dan makanan seperti produksi bahan bakar cair dan degradasi makanan ruminansia (Singhal & Rathore, 2001). Komponen yang menyusun lignoselulosa adalah lignin, hemiselulosa, dan selulosa dimana lignin berperan sebagai perekat yang membentuk ikatan kovalen dengan selulosa dan non-kovalen dengan hemiselulosa. Struktur yang demikianlah yang menyebabkan kesatuan dari dinding sel tanaman (Dwivedi *et al.*, 2011). Lignin yang terkandung dalam limbah lignoselulosa menyebabkan limbah ini sulit terdegradasi (Widiastuti & Tripanji, 2008). Lignin adalah polimer alami yang jumlahnya sangat melimpah, yaitu sekitar 15-30% pada dinding

sel gymnospermae (*softwood*) dan angiospermae (*hardwood*). Secara kimia, lignin bersifat heterogen, polimer nonaktif yang terdiri dari inter-unit phenilpropanoid yang dihubungkan oleh ikatan kovalen (Brunow, 2001). Adanya ikatan kovalen dan sifat heterogen tersebut menyebabkan lignin tidak dapat dipecah oleh enzim hidrolitik seperti polimer – polimer lain (selulosa, *starch* (kanji), protein dan lain-lain) (Hofrichter, 2002).

Di alam, hanya fungi lapuk putih Basidiomycota yang dapat mendegradasi lignin secara efisien (Wong, 2009). Akan tetapi berdasarkan penelitian lebih lanjut, Hattaka & Hammel, (2010) menambahkan bahwa Ascomycota dapat mendegradasi sebagian besar karbohidrat di tanah dan sampah, dan juga beberapa ada yang bisa mendegradasi lignin. Ascomycota dapat mendegradasi lignin dan juga berperan dalam proses pembusukan kayu yang biasa disebut sebagai “pelapuk lunak”, prosesnya masih belum diketahui, berbeda dengan Basidiomycota yang sudah diketahui dengan baik dalam mendegradasi lignin (Shary *et al.*, 2007). Meskipun demikian, sudah cukup jelas bahwa fungi pelapuk lunak dapat mendegradasi lignin (Nilson *et al.*, 1989). Wei & Dai (2004) juga menyatakan bahwa beberapa fungi *imperfecti* mempunyai kemampuan untuk mendegradasi lignin. Berdasarkan penelitian (Rohmah *et al.*, 2011), diketahui bahwa *Gliomastix* sp.2 LM1020 [Ascomycota] dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 [Imperfecti] mempunyai kemampuan dalam mendegradasi lignin dengan rasio zona bening secara berurutan sebesar 1.4 dan 1.29 pada medium lignin padat dan sebesar 46.96% dan 44.76% pada medium lignin cair.

Pada beberapa penelitian sebelumnya, masih sedikit penelitian yang fokus terhadap konsorsium fungi sebagai pendegradasi residu lignoselulosa khususnya dekomposisi bagase, degradasi limbah lignoselulosa membutuhkan sinergitas untuk memproduksi enzim oleh beberapa fungi (Dong *et al.*, 2012). Penggunaan kultur campuran diharapkan lebih berhasil meningkatkan produksi enzim daripada kultur mikroorganisme tunggal, karena kemampuan sinergisme antara jalur metabolik

antar strain saling berpengaruh dalam kultur campuran (Bader *et al.*, 2010; Dwivedi *et al.*, 2011). Hipotesis bahwa kultur campuran dapat mengakibatkan stres oksidatif pada pasangan konsorsium tersebut sehingga dapat meningkatkan hasil metabolit sekunder dan menstimulus pembusukan kayu dan produksi enzim pendegradasi lignin. Pada penelitian sebelumnya, diketahui bahwa kultur campuran fungi seperti *P. oxalicum* SAU<sub>E</sub>-3.510 dan *P. ostreatus* MTCC 1804 pada fermentasi padat (*Solid state fermentation*) dapat menghasilkan aktivitas enzim lakase tertinggi yaitu sekitar 43.70IU ml<sup>-1</sup> (Dwivedi *et al.*, 2011). Kanmani *et al.*, (2009) juga melaporkan bahwa kombinasi kultur *P. chrysosporium* dan *R. stolonifer* menunjukkan hasil biodegradasi yang baik dengan meningkatkan jumlah produksi enzim ligninolitik daripada kultur fungi tunggal.

Senyawa organik sudah banyak digunakan untuk menstimulus produksi fungal oksidoreduktase (Mougin *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2006). Penggunaan logam-logam dasar juga menawarkan banyak perspektif, seperti penggunaan logam Cu yang dapat meningkatkan produksi lakase pada fungi yang berbeda – beda (Baldrian, 2003). Penambahan Zn (0.006-18μM) ke dalam medium pertumbuhan sintetik bebas logam juga dapat meningkatkan aktivitas lignin peroksidase dan Mn-peroksidase pada *P. chrysosporium*. Mn juga berperan dalam regulasi ekspresi lignin peroksidase, mangan peroksidase, dan lakase pada degradasi lignin (Perez & Jeffries, 1992). Hubungan antara produksi lignin oksidoreduktase dengan keberadaan logam tertentu dan induksi logam dibutuhkan untuk mengontrol kemampuan fungi untuk mensekresi enzim-enzim (Lebrun, *et al.*, 2011). Logam berat dapat menurunkan kemampuan fungi untuk tumbuh dan membantu dalam produksi enzim ekstra dan intraseluler (Baldrian, 2003). Berdasarkan uraian singkat diatas, maka perlu dilakukan penelitian mengenai pengaruh logam berat terhadap aktivitas enzim ligninolitik limbah bagase secara monokultur dan kultur campuran.



## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang akan dianalisis dalam penelitian tugas akhir ini adalah bagaimana pengaruh logam  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik jamur *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 pada limbah bagase ?

## 1.3 Batasan Masalah

Adapun batasan masalah dalam penelitian tugas akhir ini adalah sebagai berikut :

1. Isolat uji yang digunakan adalah *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi, ITS.
2. Suhu inkubasi yang digunakan adalah  $30^{\circ}\text{C}$  dengan pH medium adalah 5 (suhu dan pH terbaik berdasarkan hasil penelitian sebelumnya)
3. Enzim ligninolitik yang diuji meliputi Lignin peroksidase (LiP), Mangan peroksidase (MnP) dan lakase.
4. Faktor antagonis kedua isolat fungi yang digunakan diabaikan.

## 1.4 Tujuan

Tujuan dari penelitian tugas akhir ini adalah untuk menguji pengaruh logam  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , dan  $\text{Mn}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik jamur *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 pada limbah bagase.

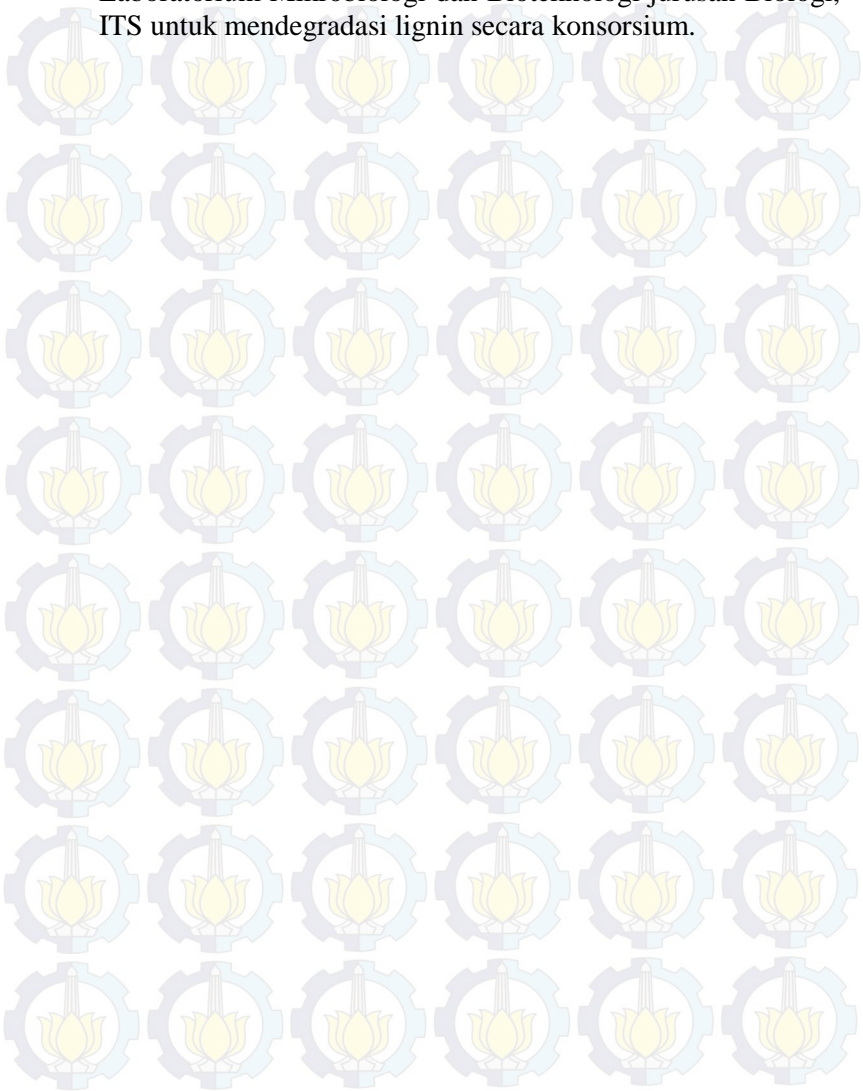
## 1.5 Manfaat

Manfaat yang diharapkan dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Mendapatkan konsentrasi *inducer* logam terbaik untuk meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik pada konsorsium *Gliomastix* sp. 2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041.



2. Menghasilkan data tambahan tentang potensi isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi jurusan Biologi, ITS untuk mendegradasi lignin secara konsorsium.



## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 Ampas Tebu**

Ampas tebu adalah suatu residu dari proses penggilingan tanaman tebu (*S. officinarum*) setelah diekstrak atau dikeluarkan niranya pada industri pemurnian gula, diperoleh hasil samping sejumlah besar produk limbah berserat yang dikenal sebagai ampas tebu (bagase) (Yuwono *et al.*, 2012). Hasil samping terbesar dari pengolahan tebu menjadi gula sukrosa adalah ampas tebu (bagase) yaitu sekitar 30 – 40% dari berat total batang tebu (Rosmeika *et al.*, 2009). Limbah ini banyak mengandung serat dan gabus (Yuwono *et al.*, 2012). Bagase merupakan residu penting pertanian yang mengakumulasi biomassa di lingkungan yang dapat digunakan untuk transformasi mikroba. Di Brazil, sekitar 80 juta ton bagase diproduksi setiap tahun. Beberapa dari biomasa ini digunakan untuk pembangkit tenaga listrik, tetapi sebagian besar tidak dimanfaatkan. Maka dari itu bagase tebu dapat digunakan untuk tujuan lain seperti produksi kertas, pupuk, makanan hewan ruminansia, produksi etanol, dan lain sebagainya. Hal ini menarik untuk dijadikan sumber karbon dalam kultur mikroba (Guimarães, 2012). Bagase memiliki komponen serat dari selulosa yang cukup besar terukur dari kandungan bahan organik dan karbon yang cukup tinggi yaitu 78.84% dan 38.62%. Kadar air bagase relatif rendah yaitu sebesar 17.35% (Tabel 2.1). Kandungan lain yang terdapat pada bagase adalah fosfat dan kalium. Adapun karakteristik dari bagase adalah sebagai berikut (Ismayana *et al.*, 2012).

Tabel 2.1. Karakteristik Bagase Tebu

Parameter	Kandungan (%)
Bahan organik	78.84
Nitrogen	0.21
Karbon	38.620
C/N ratio	160.92
Fosfor	1.755
Kalium	0.119
Kalsium	0.385
Besi	0.097
Aluminium	0.068
Mangan	<0.0000017
Magnesium	0.047
Kadar air	17.35

Bagase terdiri dari sekitar 50% selulosa dan 25% hemiselulosa dan lignin. Secara kimia, bagase terdiri sekitar 50%  $\alpha$ -selulosa, 30% pentosan, dan 2.4% abu. Karena mempunyai kandungan abu yang rendah, bagase memberikan banyak keuntungan jika dibandingkan dengan residu pertanian lain seperti jerami padi, jerami gandum yang mempunyai 17.5% dan 11.0% kandungan abu, untuk digunakan dalam proses biokonversi menggunakan mikroba kultur (Pandey *et al.*, 2000).

## 2.2 Bahan Lignoselulosa

Bahan lignoselulosa merupakan biomassa yang berasal dari tanaman dengan komponen utama lignin, selulosa, dan hemiselulosa. Ketiga senyawa tersebut membentuk suatu ikatan kimia yang kompleks dan menjadi dasar dinding sel tumbuhan. Ketersediaan bahan lignoselulosa cukup melimpah, terutama sebagai limbah pertanian, perkebunan, dan kehutanan (Hermiati *et al.*, 2010). Limbah agroindustri terdiri dari selulosa yang dapat didegradasi dengan fermentasi padat (*solid state fermentation*). Selulosa merupakan polimer linier glukuan dengan struktur rantai

yang seragam (Hermiati *et al.*, 2010). Hemiselulosa merupakan istilah umum bagi polisakarida yang larut dalam alkali. Hemiselulosa sangat dekat asosiasinya dengan selulosa dalam dinding sel tanaman (Howard *et al.*, 2003). Lima gula netral yaitu glukosa, mannanosa, galaktosa (heksosan), xilosa dan arabinosa (pentosan) merupakan konstituen utama hemiselulosa (Fengel & Wegener, 1984).

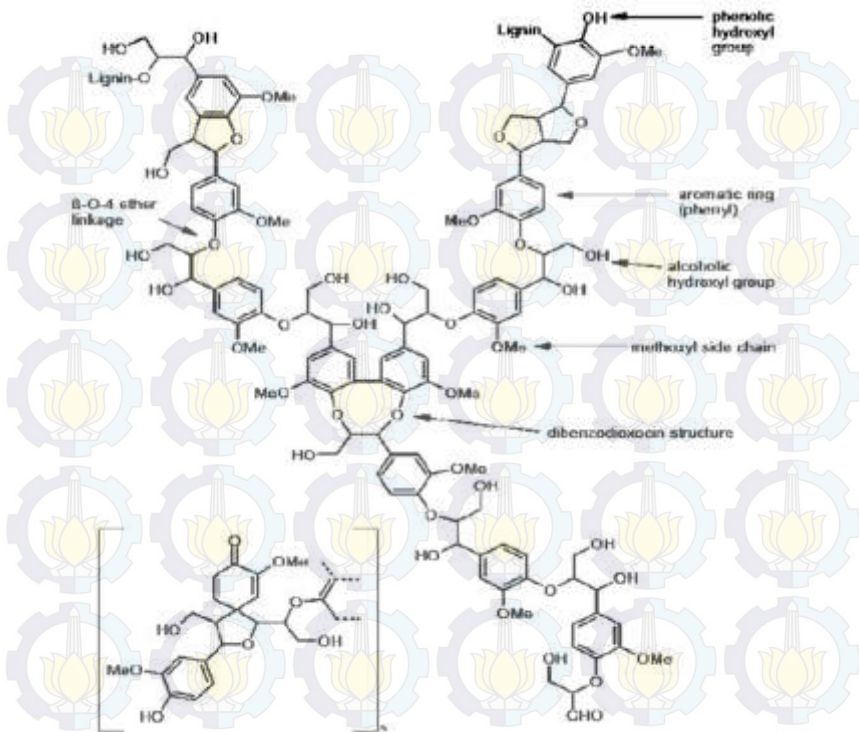
Lignoselulosa dapat dihidrolisis secara enzimatik dan diubah menjadi biofuel seperti etanol dan butanol. Proses ini dapat mentransformasi 30% energi dan mengurangi polusi lingkungan (Zhang *et al.*, 2006). Akan tetapi, keberadaan lignin yang menyelubungi hemiselulosa dan selulosa menghalangi proses hidrolisis lignoselulosa (Anderson & Akin, 2008).

### 2.3 Lignin

Lignin berasal dari bahasa latin "*lignum*" yang berarti kayu (Wong, 2009). Lignin, seperti selulosa dan hemiselulosa adalah komponen penyusun material tumbuhan dan sangat melimpah dalam bentuk karbon aromatik di biosfer (Hofrichter, 2002). Lignin ditemukan pada jaringan vaskuler tumbuhan (Wong, 2009). Sebagai senyawa aromatik, struktur lignin sangat kuat dan rapat terhadap dinding sel dan semua jaringan vaskuler tumbuhan yang berperan sebagai pelekatan antara filamen polisakarida dan serat. Selain itu, lignin terlibat dalam transportasi air di tumbuhan dan membentuk penghalang terhadap mikroba perusak dengan melindungi polisakarida (Monties & Fukushima, 2001).

Secara kimia, lignin bersifat heterogen, polimer nonaktif yang terdiri dari inter-unit phenilpropanoid yang dihubungkan oleh ikatan kovalen (Gambar 2.1) (Brunow, 2001). Lignin pada dasarnya tersusun atas unit *p*-hydroxyphenyl, guaiasil, dan syringyl (Gambar 2.2a) yang berkombinasi dengan monomer lignin yaitu sinapil alkohol, *p*-kumaril, koniferil alkohol (Gambar 2.2b) (Perez *et al.*, 2002).

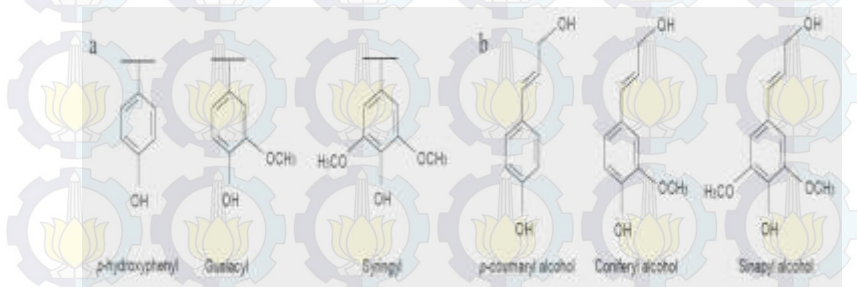




Gambar 2.1 Struktur Lignin

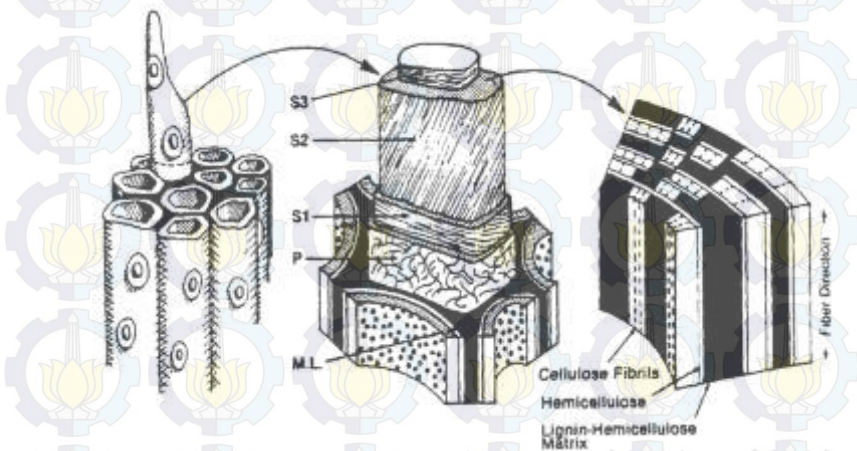
Dekomposisi lignin berlangsung sangat lambat di lingkungan karena struktur kimianya yang kompleks, heterogen, tidak larut dalam air, dan aromatis sehingga lignin bersifat rekalsitran (Tuomela, 2002). Kompleksitas dan sifat tidak mudah dipecah dari lignin pada beberapa spesies bergantung pada bagaimana unit penyusun lignin tersebut berkombinasi dalam proses polimerisasi. Pada *softwood* (gymnospermae) mempunyai kandungan lignin yang tinggi dan terdiri dari unit guaiasil. Sedangkan pada *hardwood* (angiospermae) terdiri dari unit syringyl, guaiasil, dan beberapa elemen *p*-hydroxyphenyl (Martinez *et al.*, 2005). Dari segi morfologi (Gambar 2.3), lignin merupakan senyawa amorf

yang terdapat dalam lamela tengah maupun dalam dinding sekunder. Selama perkembangan sel, lignin dimasukkan sebagai komponen terakhir di dalam dinding sel, menembus diantara fibril-fibril sehingga memperkuat dinding sel (Fengel dan Wegener 1995).



Gambar 2.2 Struktur dasar biosintesis lignin.

Keterangan : a) Unit struktur lignin; b) Monomer lignin (Fernandez, 2011).



Gambar 2.3 Ilustrasi molekuler jaringan tumbuhan dan hubungan dengan lignin, hemicelulosa dan selulosa.

Keterangan : S1-S3, lapisan dinding sel sekunder; P, dinding primer; dan M,L., lamela tengah (*Middle Lamela*) (Goring, 1977).

Enzim pendegradasi lignin terdiri dari tiga enzim oksidatif yaitu lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP) dan lakase. Enzim tersebut digunakan secara luas dalam mengurangi polusi, khususnya pengolahan limbah yang mengandung senyawa berbahaya seperti pewarna, phenol dan senyawa xenobiotik lainnya (Niladevi, 2009). LiP dan MnP menggunakan  $H_2O_2$  sebagai oksidan (Hatakka, 2001) (Tabel 2.2). LiP mengoksidasi inti aromatik (fenolik dan non fenolik) melalui pelepasan satu elektron menghasilkan radikal kation dan fenoksi (Akhtar *et al.*, 1997).

Tabel 2.2. Peranan Enzim pada Degradasi Lignin dan Reaksi

Aktivitas Enzim	Kofaktor / substrat, "mediator"	Reaksi
LiP	$H_2O_2$ , Veratril alkohol	Cincin aromatik teroksidasi menjadi radikal kation
MnP	$H_2O_2$ , Mn, asam organik sebagai khelator, thiols, lemak tak jenuh	Mn (II) teroksidasi menjadi Mn (III); Mn (III) yang terkhelat mengoksidasi senyawa fenolik menjadi fenolik radikal.
Lakase	$O_2$ , mediator seperti <i>Hydroxybenzotriazole</i> (ABTS)	Fenol dioksidasi menjadi fenoksi radikal.

Mangan peroksidase (MnP) membutuhkan  $Mn^{2+}$  sebagai substrat reduksinya (Steffen, 2003). MnP akan mengoksidasi senyawa Mn(II) menjadi Mn (III) yang kemudian mengoksidasi struktur fenolik menjadi radikal fenoksi.  $Mn^{3+}$  yang terbentuk sangat reaktif dan membentuk kompleks dengan *chelating* asam organik seperti asam oksalat atau malat (Kishi *et al.*, 1994). Dengan bantuan *chelator*, ion  $Mn^{3+}$  distabilkan dan dapat menembus ke dalam jaringan substrat (Steffen, 2003).

Lakase merupakan fenoksi oksidasi yang mengandung tembaga ( $Cu^{2+}$ ) dan menggunakan oksigen sebagai elektron aseptornya. Selain itu juga mengoksidasi cincin fenolik menjadi fenoksil radikal. Selain itu lakase juga mampu mengoksidasi



senyawa non-fenolik dibawah kondisi tertentu, seperti ketika suatu reaksi ditambahkan dengan ABTS (Hatakka, 2001).

## 2.4 Fungi Pendegradasi Lignin

Fungi merupakan mikroorganisme yang hidup bebas, dan umumnya sering dijumpai pada tanah dan tempat yang mempunyai kelembaban relatif tinggi. Persebaran fungi sangat luas di alam, dan termasuk dekomposer primer yang mengoksidasi bahan – bahan organik (Tchnobanoglous *et al.*, 2003). Fungi pelapuk kayu dibedakan atas pelapuk putih, pelapuk coklat, dan pelapuk lunak. Masing-masing memiliki metabolisme degradatif yang berbeda. Fungi pelapuk putih menyerang lignin maupun polisakarida. Kayu yang terdegradasi menjadi putih dan lunak. Fungi pelapuk coklat mendegradasi polisakarida kayu dan mendegradasi sedikit lignin sehingga kayu menjadi coklat dan rapuh. Sedangkan fungi pelapuk lunak lebih menyukai selulosa dan hemiselulosa sebagai substratnya (Fengel & Wegener, 1995) dan hasil degradasi berwarna coklat (Hatakka, 2001).

Fungi pelapuk lunak (*soft-rots fungi*) merupakan kelompok dari Ascomycota dan Deuteromycota. Mekanisme dalam mendegradasi kayu yaitu hifa tumbuh pada sel lumen kayu, biasanya setelah hifa masuk melalui rongga pada dinding sel tanaman. Kemudian hifa melakukan penetrasi pada lapisan dinding sel yang tipis (S3) supaya bisa masuk pada lapisan dinding sel yang tebal dan kaya akan selulosa (S2). Lalu hifa akan membentuk formasi T (*T-shaped*) dan mensekresi enzim selulose. Enzim tersebut akan berdifusi ke dalam sel dan terjadi degradasi kayu yang ditandai dengan terbentuknya rongga rhomboidal di dalam dinding sel (Arora *et al.*, 1991; Deacon, 2005).

Fungi pelapuk putih (*white-rots fungi*) dapat mendegradasi selulosa dan lignin. Kelompok fungi yang termasuk dalam pelapuk putih adalah Ascomycota, seperti *Xylaria* spp. dan Basidiomycota, seperti *Armillariella mellea*. Pada kondisi miskin nitrogen, fungi ini akan menghasilkan enzim ekstraseluler dan

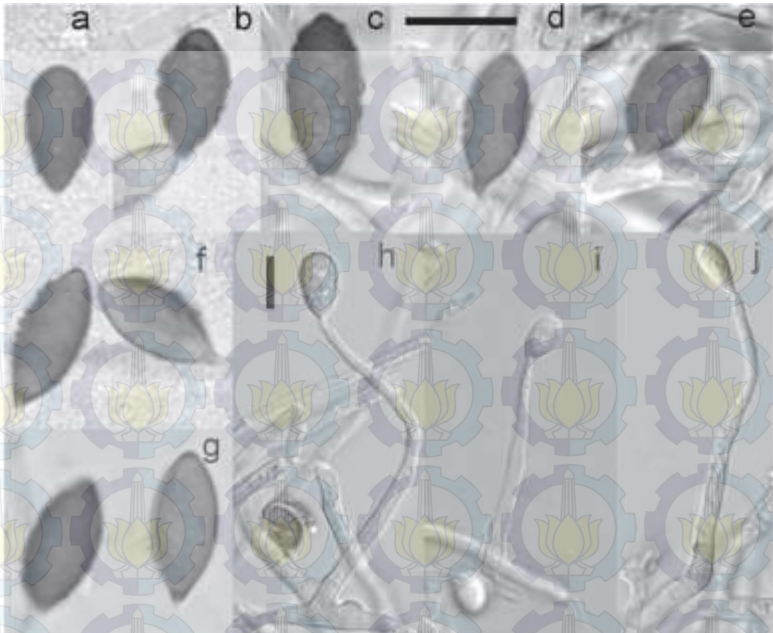


sangat efisien dalam memanfaatkan nitrogen dalam miselia (Deacon, 2005).

Fungi pelapuk coklat (*brown-rot fungi*) didominasi oleh kelompok Basidiomycota. Hifa fungi pelapuk coklat ini sangat jarang ditemui pada kayu, seringkali jumlahnya terbatas pada lumen dinding sel kayu. Hifa tersebut menyebabkan dekomposisi pada lapisan S2. Jenis degradasi ini tidak dapat dijelaskan dengan difusi enzim selulase karena terlalu luas untuk melalui rongga pada lapisan S3 seperti halnya pada *soft-rot fungi*. Fungi pelapuk coklat ini mendegradasi selulosa melalui proses oksidatif (Deacon, 2005). Beberapa fungi yang diketahui mampu mendegradasi lignin yaitu *Gliomastix* sp. LM1020, *Mortiriella* sp., dan *Mycelia sterilia* sp. LM1041 (Rohmah *et al.*, 2011), *Fusarium oxysporum* (Singh, 2006), *Fusarium solani* (Lozovoya, 2006).

## 2.5 *Gliomastix* sp.

*G. fusigera* adalah salah satu dari dua spesies *Gliomastix* yang mempunyai konidia yang dicirikan dengan panjang lebih dari 12  $\mu\text{m}$ . *G. fusigera* merupakan bentuk anamorfik dari *Hydropisphaera bambusicola*. Pada umumnya mempunyai hifa yang lembut berwarna putih seperti kapas, warna margin sel putih, sporulasi sedikit. Pertumbuhan *G. fusigera* selama 2 minggu dapat mencapai diameter 24 mm dengan hifa aerial yang tipis dan *hyaline*. Miselium tumbuh dengan percabangan hifa, berseptat, tekstur halus, dan mempunyai lebar sekitar 3-5  $\mu\text{m}$ . Konidiospora terbentuk pada hifa aerial, tidak bercabang, memanjang dan tegak/lurus, *hyaline* hingga coklat cerah, permukaan halus hingga sedikit kasar. Sel Konidiogenus monophialide (Gambar 2.4) (Lechat *et al.*, 2010). Pada *G. guttuliformis* konidiospora dihasilkan dari permukaan miselium atau sepanjang hifa (Brown, 1958).



Gambar 2.4 *Gliomastix fusigera*.

Keterangan: a-g: Konidia, h-j: konidiospora dan sel konidiogenus (Lechat *et al.*, 2010).

Adapun klasifikasi *Gliomastix* sp. adalah sebagai berikut :

Kingdom : Fungi  
 Filum : Ascomycota  
 Kelas : Ascomycetes  
 Suku : Hypocreales  
 Famili : Bionectriaceae  
 Genus : Gliomastix  
 Spesies : *Gliomastix* sp.

(Global Biodiversity Information Facility, 2015).

Akhir – akhir ini mulai banyak penelitian yang fokus terhadap degradasi limbah industri oleh fungi untuk menyelesaikan masalah – masalah lingkungan. Penelitian baru-baru ini melaporkan bahwa *G. indicus* MTCC 3869 telah

digunakan untuk biodegradasi fenol, resorcinol, dan *p*-cresol pada limbah sintesis (Kumar *et al.*, 2013). Genus *Gliomastix* sp.2 LM1020 juga dapat mendegradasi lignin dengan rasio zona bening sebesar 1.4 pada medium lignin padat dan sebesar 46.95% pada medium lignin cair (Rohmah *et al.*, 2011).

## 2.6 *Mycelia sterilia*

*Mycelia sterilia* merupakan kelompok fungi yang defisiensi dalam produksi spora (Hawksworth, Sutton & Aisworth, 1983). Sistematika fungi modern yaitu berdasarkan morfologi spora dan struktur penghasil spora, jadi ketiadaan diantara keduanya membuat isolat *Mycelia sterilia* hampir tidak teridentifikasi. Sehingga, tidak ada nama yang spesifik untuk menyebutkan isolat tersebut. Berdasarkan sejarah, kelompok fungi ini termasuk ke dalam fungi *Imperfecti*. Fungi kelompok *Mycelia sterilia* keberadaannya melimpah di alam. Umumnya ditemukan pada habitat tanah, tumbuhan dan runtunan tanaman. Beberapa kelompok fungi ini mampu membusukkan kayu (Taylor & Parkinson, 1965). Banyak fungi sterilia umumnya ditemukan pada akar tanaman dan beberapa bersifat endofit (Mucciarelli *et al.*, 2002). *Mycelia sterilia* sp. 2 LM1041 merupakan genus yang dapat mendegradasi lignin dengan rasio zona bening 1.29 pada medium lignin padat dan sebesar 44.76% pada medium lignin cair (Rohmah *et al.*, 2011).

## 2.7 Pengaruh Logam Berat dalam Degradasi Lignin

Logam berat dapat menurunkan kemampuan fungi untuk tumbuh dan memproduksi enzim ekstra dan intraseluler (Baldrian, 2003). Beberapa logam berat dibutuhkan dalam metabolisme fungi, meskipun belum diketahui peranan biologisnya. Logam berat esensial maupun non-esensial bersifat toksik untuk fungi, ketika keberadaannya berlebih. Meskipun fungi mempunyai ketentuan metabolik tersendiri untuk memecah logam, logam yang sama sering kali bersifat toksik jika konsentrasinya cukup besar dari yang dibutuhkan (Hughes &



Poole, 1991). Logam yang dibutuhkan untuk pertumbuhan fungi meliputi tembaga, besi, manganese, molybdenum, zink dan nikel. Logam non – esensial umumnya terdiri dari kromium, kadmium, timah, merkuri dan perak (Gadd, 1993).

Pada fungi pelapuk putih, tembaga dan manganese dapat digunakan secara langsung dalam proses degradasi lignin. Manganese berperan dalam reaksi siklus *Mn-dependent peroxidase*, dan tembaga berperan sebagai kofaktor pada pusat katalitik lakase. Tembaga diketahui bersifat toksik pada kebanyakan fungi meskipun dalam konsentrasi rendah. Fungi pelapuk putih dapat mengatasi tingkat toksisitas logam berat selama masih tumbuh di tanah. Konsentrasi dan keberadaan logam berat di tanah biasanya lebih tinggi daripada di kayu (Baldrian, 2003). Logam berat di lingkungan dapat langsung berinteraksi dengan enzim ekstraseluler fungi. Fungi pelapuk putih dapat mengakumulasi logam dari substrat dalam miseliumnya. Setelah masuk ke dalam sel fungi, logam dapat mempengaruhi produksi enzim ekstraseluler pada tingkat regulasi transkripsi dan translasi (Baldrian, 2003).

Pada penelitian Sanghal dan Rathore (2001), tentang pengaruh logam Zn dan Cu terhadap aktivitas enzim ligninolitik *P. chrysosporium*, menjelaskan bahwa konsentrasi logam tertentu dapat meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik. Pada penelitian tersebut digunakan medium basal yang mengandung konsentrasi logam yang bervariasi yaitu  $\text{Zn}^{2+}$  dengan konsentrasi  $6.0 \times 10^{-3}$  hingga  $18.0 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ . Sedangkan Cu dengan konsentrasi  $4.0 \times 10^{-4}$  hingga  $1.2 \times 10^{-4}$ . Aktivitas LiP dan MnP meningkat seiring dengan tingginya konsentrasi logam  $\text{Zn}^{2+}$  (Tabel 2.3). Pada konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  tertinggi ( $18.0 \mu\text{M}$ ) aktivitas LiP lebih tinggi 2 kali lipat dibandingkan dengan konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  rendah ( $0.006 \mu\text{M}$ ). Aktivitas MnP juga meningkat pada konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  tertinggi yaitu sekitar 77% (1.8 kali lipat) dibandingkan dengan konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  terendah. Aktivitas LiP dan MnP juga meningkat seiring meningkatnya konsentrasi logam  $\text{Cu}^{2+}$ . Pada konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  tertinggi ( $1.2 \mu\text{M}$ ) peningkatan aktivitas LiP terjadi hingga



65% dibandingkan dengan konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  terendah. Begitupula dengan aktivitas MnP yang terus meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$ .

Tabel 2.3 Pengaruh Konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  pada *P. chrysosporium* (MTCC-787)

$\text{Zn}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Biomassa miselium <sup>a</sup> (mg)	Aktivitas $\text{LiP}^b \text{A}_{310} \text{ min}^{-1}$ $\text{ml}^{-1}$ filtrat kultur	Aktivitas MnP <sup>b</sup> $\text{A}_{465} \text{ min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ filtrat kultur
0.006	$30.2 \pm 2.1$	$0.042 \pm 0.001$	$0.043 \pm 0.001$
0.06	$33.5 \pm 2.1$	$0.058 \pm 0.002$	$0.054 \pm 0.002$
0.6	$37.7 \pm 4.2$	$0.061 \pm 0.004$	$0.062 \pm 0.002$
6.0	$34.4 \pm 2.0$	$0.078 \pm 0.003$	$0.064 \pm 0.001$
18.0	$30.7 \pm 3.6$	$0.092 \pm 0.001$	$0.076 \pm 0.003$

<sup>a</sup> Biomassa miselium selama 3 minggu setelah inokulasi

<sup>b</sup> aktivitas LiP dan MnP pada filtrat kultur hari ke-5 inokulasi

Tabel 2.4 Pengaruh Konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  pada *P. chrysosporium* (MTCC-787)

$\text{Cu}^{2+}$ ( $\mu\text{M}$ )	Biomassa miselium <sup>a</sup> (mg)	Aktivitas $\text{LiP}^b \text{A}_{310} \text{ min}^{-1}$ $\text{ml}^{-1}$ filtrat kultur	Aktivitas MnP <sup>b</sup> $\text{A}_{465} \text{ min}^{-1} \text{ml}^{-1}$ filtrat kultur
0.0004	$29.8 \pm 0.7$	$0.054 \pm 0.003$	$0.037 \pm 0.001$
0.004	$36.5 \pm 3.6$	$0.057 \pm 0.002$	$0.045 \pm 0.001$
0.04	$37.7 \pm 4.2$	$0.061 \pm 0.004$	$0.062 \pm 0.002$
0.4	$40.6 \pm 7.1$	$0.080 \pm 0.001$	$0.069 \pm 0.002$
1.2	$36.2 \pm 3.3$	$0.089 \pm 0.002$	$0.075 \pm 0.001$

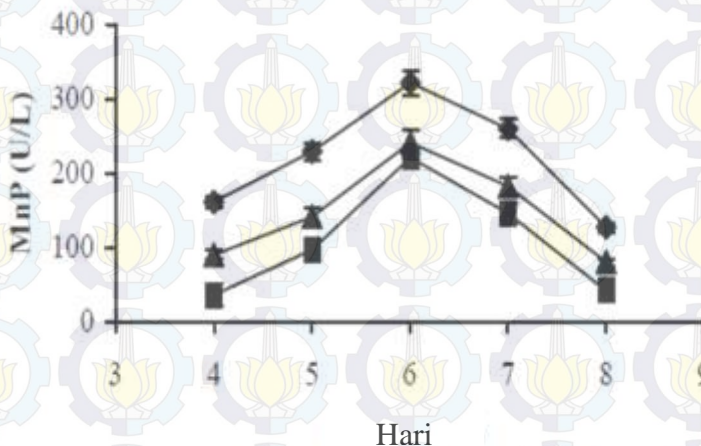
<sup>a</sup> Biomassa miselium selama 3 minggu setelah inokulasi

<sup>b</sup> aktivitas LiP dan MnP pada filtrat kultur hari ke-5 inokulasi

Konsentrasi yang rendah dari logam berat esensial dibutuhkan untuk perkembangan sistem enzim ligninolitik. Penambahan konsentrasi logam Zn (0.006 – 18  $\mu\text{M}$ ) kedalam medium pertumbuhan sintetik bebas logam dapat meningkatkan aktivitas lignin peroksidase dan Mn-peroksidase pada *P.*

*chrysosporium*. Logam juga meningkatkan kelarutan dan mineralisasi lignin. Semakin tinggi konsentrasi Zn semakin tinggi pula aktivitas enzim LiP dan MnP dimana pada konsentrasi 18  $\mu\text{M}$  aktivitas logam LiP dan MnP berturut-turut meningkat sebesar 1.5 kali lipat dan 1.2 kali lipat. Penambahan konsentrasi logam Cu (0.0004 - 1.2  $\mu\text{M}$ ) juga mampu meningkatkan enzim LiP dan MnP berturut-turut sebesar 1.4 dan 1.2 kali lipat pada konsentrasi 1.2  $\mu\text{M}$  dibandingkan dengan konsentrasi 0.04  $\mu\text{M}$  (Singhal & Rathore, 2001).

Mn juga berperan dalam regulasi ekspresi lignin peroksidase, MnP, Lakase pada degradasi lignin (Perez & Jeffries, 1992). Pengaruh penambahan beberapa konsentrasi logam Mn (100, 174, dan 354  $\mu\text{M}$ ) dapat meningkatkan aktivitas MnP pada *P. Chrysosporium* (Gambar 2.5). Aktivitas enzim tertinggi yaitu pada konsentrasi logam Mn 174  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 321.1 U/L (Urek & Pazarlioglu, 2007).



Gambar 2.5. Aktivitas MnP pada konsentrasi yang bervariasi terhadap waktu inkubasi pada pH 4.5 dan suhu 37°C. Keterangan : (- ▲-) : 100  $\mu\text{M}$ , (- ◆-) : 174  $\mu\text{M}$ , (- ■-) : 354  $\mu\text{M}$ .

## **BAB III**

### **METODOLOGI**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – Juni 2015. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya.

#### **3.2 Alat, Bahan, dan Cara Kerja**

##### **3.2.1 Subkultur Isolat Uji**

Isolat uji yang digunakan adalah *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 yang merupakan koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi ITS, Surabaya yang diisolasi dari Wonorejo, Pantai Timur Surabaya. Isolat *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 disubkultur pada medium PDA-C miring (*slant agar*) dalam tabung reaksi secara duplo. Satu kultur untuk kultur stok dan yang lainnya untuk kultur kerja. Kultur tersebut diinkubasi selama 7 hari pada suhu kamar dalam kondisi aerob. Kultur stok kemudian disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C selama 30 hari untuk sediaan biakan, sedangkan kultur kerja digunakan dalam proses selanjutnya (Modifikasi dari Hossain & Anantharaman, 2006).

##### **3.2.2 Preparasi Suspensi Inokulum**

Kultur isolat yang berusia 7 hari pada *slant agar* PDA-C dalam tabung reaksi, ditambahkan 5 ml aquades steril ke dalamnya. Kemudian dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi secara aseptis. Tabung reaksi divortex untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Jumlah spora dihitung dengan menggunakan *Haemocytometer Neubauer* untuk mendapatkan  $10^6$  spora/ml yang akan digunakan sebagai



inokulum (Modifikasi dari Singhanian *et al.*, 2006; Hossain & Anantharaman, 2006).

### 3.2.3 Pembuatan Medium Basal-*Chloramphenicol*

Medium basal dalam 1 liter aquades dibuat dengan komposisi sebagai berikut : 2 gr ekstrak yeast, 1 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,5 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,2 gr  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,2 gr  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan 0,2 gr  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Komposisi medium disiapkan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 1000 ml. Setelah itu ditambahkan aquades hingga volume 1 L. Medium dipanaskan dengan *magnetic stirrer* hingga homogen. Medium basal dikondisikan pada pH 5 dengan menambahkan NaOH 1 M dan HCl 1 M. Kemudian dilakukan proses sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu  $121^\circ\text{C}$ , 1,5 atm selama 15 menit. Penambahan 0,5 gr *chloramphenicol* ke dalam medium dilakukan sebelum sterilisasi (Modifikasi dari Astri & Sharma, 2011).

### 3.2.4 Pre-Treatment Limbah Bagase

Penelitian ini menggunakan substrat organik dari limbah bagase tebu yang berasal dari limbah jualan es tebu yang berada di sepanjang jalan daerah Kampus ITS. Substrat tersebut digunakan sebagai medium pertumbuhan isolat uji (*Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041). Sebelum digunakan, limbah bagase diberi perlakuan secara mekanik yaitu limbah bagase tebu diambil sebanyak 2 kg. Kemudian dicuci 4x dengan air untuk menghilangkan substansi yang tidak diperlukan, lalu dikering-anginkan di bawah sinar matahari dan oven hingga kering. Substrat dipotong-potong  $\pm 3\text{cm}$  dan digiling dengan mesin penggiling dengan ukuran saringan 25 mm untuk mendapatkan partikel yang berukuran seragam (Hossain & Anantharaman, 2006).



### 3.2.5 Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan pada medium lignin-alkali yang ditambahkan medium basal (LAC + MB). Dilakukan pembuatan medium basal sebanyak 1L yang ditambahkan 2.5 gram lignin-alkali kemudian diaduk hingga homogen. Disiapkan 14 erlenmeyer 250 ml, kemudian medium dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer sebanyak 50 ml. Dilakukan pengukuran pH medium hingga pH 5. Dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C, 1,5 atm selama 15 menit. Dilakukan inokulasi Isolat *Gliomastix* sp.2 LM1020 dan *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 dengan konsentrasi 10<sup>6</sup> spora/ml secara monokultur dan konsorsium (1:1) sebanyak 10% ke dalam masing-masing medium secara aseptis. Diinkubasi pada *rotary shaker* dengan suhu 30<sup>0</sup>C. Pertumbuhan dikontrol setiap 24 jam selama 14 hari (Morris *et al.*, 1996) dengan mengukur nilai biomasanya. Suspensi kultur disaring dengan menggunakan kertas saring whatman no.42 (2.5 $\mu$ m). Kemudian kertas saring dioven hingga kering. Nilai biomassa diperoleh dengan menimbang berat kering kertas saring yang digunakan. Data biomassa yang diperoleh kemudian disajikan dalam bentuk kurva pertumbuhan.

### 3.2.6 Pembuatan Starter

Pembuatan starter dilakukan pada medium fermentasi padat. Disiapkan medium basal pH 5. Ditimbang serbuk bagase sebanyak 2.5 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml. Kemudian ditambahkan medium basal sebanyak 12.5 ml. Diaduk supaya kelembapan dalam medium merata. Medium disterilisasi dengan autoklaf suhu 121<sup>0</sup>C, 1,5 atm selama 15 menit. Sebanyak 1.5 ml suspensi spora (10<sup>6</sup> spora/ml) diinokulasikan dalam erlenmeyer 250 ml yang berisi medium fermentasi secara monokultur dan konsorsium (1:1). Selanjutnya kultur diinkubasi dengan masa inkubasi sesuai dengan hasil kurva pertumbuhan pada suhu ruang. Setelah itu, miselium yang tumbuh pada medium basal ini kemudian disebut sebagai starter kultur.

### 3.2.7 Pembuatan Larutan DNS

Larutan Asam 3,5-dinitrosalisilat (DNS) dibuat dengan menimbang 1 g NaOH, dilarutkan dengan 60 ml akuades, ditambahkan 18,2 g Na-K Tartrat, 1 g asam 3,5-dinitrosalisilat (ditambahkan secara perlahan sambil diaduk hingga larut sempurna), kemudian ditambah 0,2 g fenol untuk menstabilkan warna dan 0,05 g  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Lalu dipindahkan kedalam labu ukur, kemudian diencerkan dengan akuades hingga 100 mL dan dikocok hingga homogen.

### 3.2.8 Tahap Optimasi Produksi Enzim Ligninolitik

Optimasi enzim ligninolitik dilakukan dengan menggunakan fermentasi padat. Disiapkan erlenmeyer 250 ml kemudian substrat bagase kering yang sudah melalui tahapan *pretreatment* diambil sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan 25 ml medium basal pH 5. Medium basal yang ditambahkan sudah mengandung logam berat yang akan diujikan yaitu  $\text{CuSO}_4$  dengan konsentrasi 0,4  $\mu\text{M}$ , 1,2  $\mu\text{M}$ , dan 2  $\mu\text{M}$ ,  $\text{ZnSO}_4$  dengan konsentrasi 6  $\mu\text{M}$ , 18  $\mu\text{M}$ , dan 54  $\mu\text{M}$ , serta  $\text{MnSO}_4$  dengan konsentrasi 100  $\mu\text{M}$ , 174  $\mu\text{M}$ , dan 248  $\mu\text{M}$ . Erlenmeyer kemudian ditutup dengan sumbat dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada 121°C selama 15 menit. Setelah itu ditambahkan starter fungi ke dalam masing-masing erlenmeyer. Lalu, diinkubasi pada suhu 30°C selama 30 hari. Percobaan dilakukan sebanyak 2x ulangan (Modifikasi dari Kanmani *et al.*, 2009; Parani & Eyini, 2012).

### 3.2.9 Uji Aktivasi Enzim Ligninolitik

Pada pengukuran aktivitas enzim ligninolitik, biakan fungi yang telah tumbuh pada medium bagase setelah masa akhir fermentasi ditambahkan dengan buffer fosfat pH 7 hingga terlarut kemudian di vortex hingga homogen. Dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf lalu disentrifugasi pada kecepatan 2000 rpm selama 20 menit. Supernatan hasil sentrifuge dipisahkan dari

endapannya dan dimasukkan ke dalam tabung Eppendorf lainnya. Jika supernatan yang diperoleh masih keruh, maka dilakukan sentrifugasi ulang dengan kecepatan, waktu dan kondisi yang sama hingga diperoleh supernatan yang jernih (Widiastuti *et al.*, 2007).

#### a. Aktivitas Enzim LiP

Aktivitas enzim LiP dianalisis berdasarkan reaksi oksidasi veratril alkohol menjadi veratril aldehid (Castillo *et al.*, 1997) pada panjang gelombang 310 nm. Untuk melakukan analisis diperlukan komposisi bahan-bahan seperti berikut ini: 0.1 ml 8 mM veratril alkohol, 0.2 ml 50 mM buffer asetat pH 3, 0.45 ml akuades, 0.05 ml 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dan 0.2 ml filtrat enzim. Semua bahan tersebut selanjutnya dimasukkan ke dalam kuvet dengan ukuran 2 ml, lalu dikocok secara perlahan kemudian absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer pada 0 dan 60 menit (Tien & Kirk 1984). Perhitungan aktivitas enzim menggunakan rumus sebagai berikut (Herliyana *et al.*, 2011):

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{(\Delta t) \times V_{\text{tot}}(\text{ml}) \times 10^9}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times V_{\text{enzim}}(\text{ml}) \times t}$$

Keterangan :

- $\Delta t$  : Selisih Absorbansi pada menit ke-0 dan menit ke-60
- $V_{\text{tot}}$  : Volume total bahan (ml)
- $V_{\text{enzim}}$  : Volume filtrat enzim (ml)
- $\epsilon_{\text{maks}}$  : Absorptivitas molar veratril alkohol (9300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)
- $d$  : Tebal kuvet (1 cm)
- $t$  : Waktu (menit)

#### b. Aktivitas Enzim MnP

Aktivitas enzim MnP diukur berdasarkan reaksi dengan guaiakol pada panjang gelombang 465 nm. Untuk melakukan analisis diperlukan bahan-bahan dengan komposisi sebagai berikut: 0.1 ml 50 mM buffer Na-laktat pH 4.5, 0.1 ml 4 mM guaiakol, 0.1 ml 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.5 ml akuades, dan 0.2 ml filtrat



enzim. Semua bahan dimasukkan ke dalam kuvet ukuran 2 ml, lalu dikocok secara perlahan kemudian absorbansinya dibaca dengan spektrofotometer pada 0 dan 60 menit. Perhitungan aktivitas enzim diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Herliyana *et al.*, 2011):

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{(\Delta t) \times V_{\text{tot}} \text{ (ml)} \times 10^9}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times \text{Vol enzim (ml)} \times t}$$

Keterangan :

- $\Delta t$  : Selisih absorbansi pada menit ke-0 dan ke-60
- $V_{\text{tot}}$  : Volume total bahan (ml)
- $V_{\text{enzim}}$  : Volume filtrat enzim (ml)
- $\epsilon_{\text{maks}}$  : Absorpsivitas molar guaiakol ( $12100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )
- $d$  : Tebal kuvet (1 cm)
- $t$  : Waktu (menit)

### c. Aktivitas Enzim Lakase

Aktivitas lakase diketahui dengan mengukur oksidasi 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6sulfonic acid) (ABTS) pada campuran reaksi yang berisi 0.4 ml filtrat enzim, 0.5 ml buffer asetat 0.5M pH 5 dan 0.1 ml ABTS 1 mM (Cupul *et al.*, 2014). Campuran ini dimasukkan ke dalam kuvet sebanyak 2 ml kemudian dikocok. Setelah dikocok, larutan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 420 nm dengan interval waktu 0 dan 30 menit. Aktivitas enzim diukur berdasarkan persamaan berikut:

$$\text{Aktivitas enzim (U/ml)} = \frac{(\Delta t) \times V_{\text{total}} \text{ (ml)} \times 10^9}{\epsilon_{\text{maks}} \times d \times \text{Vol enzim (ml)} \times t}$$

Keterangan :

- $\Delta t$  : Selisih absorbansi pada menit ke-0 dan ke-60
- $V_{\text{tot}}$  : Volume total bahan (ml)
- $V_{\text{enzim}}$  : Volume filtrat enzim (ml)
- $\epsilon_{\text{maks}}$  : Absorbtivitas molar ABTS ( $36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )



- d : Tebal kuvet (1 cm)  
t : Waktu (menit)

#### **d. Aktivitas Enzim Selulase**

Aktivitas enzim selulase (CMCase) diuji dengan mencampurkan 0.9 ml 1% (w/v) CMC (pH 5.3 yang dibuat dengan buffer 50 mM Na-asetat), 0.1 ml filtrat enzim kemudian diinkubasi pada suhu 50°C selama 15 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml 3,5-*dinitrosalicylic* (DNS) dan dipanaskan selama 15 menit. Larutan didinginkan pada air mengalir kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah gula pereduksi diukur dengan menggunakan glukosa sebagai standar (Sridevi & Charya, 2011). Aktivitas enzim diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{x \cdot v}{a \cdot b}$$

Keterangan :

- x : Konsentrasi glukosa  
v : Volume total campuran  
a : Volume enzim  
b : Waktu inkubasi

#### **e. Aktivitas Enzim Xilanase**

Aktivitas enzim xilanase diuji dalam 3 ml campuran yang terdiri dari 0.33 ml filtrat enzim, 0.33 ml 1% substrat xilan (pH 5.3 yang dibuat dengan buffer 0.05 M Na-sitrat) dan 0.33 ml 0.05 M buffer sitrat. kemudian diinkubasi pada suhu 55°C selama 10 menit. Reaksi dihentikan dengan menambahkan 1 ml 3,5-*dinitrosalicylic* (DNS) dan dipanaskan selama 15 menit. Larutan didinginkan pada air mengalir kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm. Jumlah gula pereduksi diukur dengan menggunakan xilosa sebagai standar (Sridevi & Charya, 2011). Aktivitas enzim diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{x \cdot v}{a \cdot b}$$

Keterangan :

- x : Konsentrasi glukosa
- v : Volume total campuran
- a : Volume enzim
- b : Waktu inkubasi

### 3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data

Penelitian ini disusun berdasarkan Rancangan Acak Lengkap dengan 36 perlakuan dan 2 kali ulangan. Variabel bebas yang digunakan adalah variasi isolat dan konsentrasi logam berat. Sedangkan variabel terikat yaitu aktivitas enzim ligninolitik. Komponen enzim yang diukur adalah Lignin Peroksidase (LiP), Mangan peroksidase (MnP), lakase. Semua data dianalisis secara statistik menggunakan analisis varian (ANOVA) melalui program *Statistical Analysis System* (SAS) dan perbedaan pada setiap perlakuan diuji dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) 5%.

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Kurva Pertumbuhan**

Optimasi kultur *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 dan *Gliomastix* sp.2 LM1020 sebagai penghasil enzim ligninolitik dilakukan dengan pengukuran kurva pertumbuhan dari berat kering miselium kultur setiap hari selama 14 hari. Menurut Langvad (1999), Pertumbuhan fungi berfilamen pada kultur cair baik secara stasioner maupun dengan agitasi biasanya diukur berdasarkan peningkatan berat kering sel.

Sebelum pembuatan kurva pertumbuhan, dilakukan beberapa tahap persiapan diantaranya yaitu subkultur isolat uji, preparasi suspensi inokulum, dan pembuatan medium pertumbuhan fungi. Subkultur dilakukan untuk menumbuhkan dan *recovery* isolat fungi yang akan digunakan untuk kerja. Subkultur dilakukan pada medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang merupakan medium non-selektif yang komposisi utamanya adalah ekstrak kentang. Menurut Dinar (2010), kandungan karbohidrat pada kentang mencapai sekitar 18%. Karbohidrat yang tinggi tersebut dapat memicu dan meningkatkan pertumbuhan khamir dan kapang dalam medium (Yousef & Carlstrom, 2003 ).

Medium PDA ditambahkan dengan *chloramphenicol* sebagai antibiotik antibakteri sebelum disterilisasi dengan autoklaf. Menurut Mueller *et al.* (2004), *Chloramphenicol* merupakan antibiotik yang stabil terhadap panas, berbeda dengan antibiotik lainnya seperti *streptomycin sulfate*, *chlortetracycline*, *ampicilin*, dan *vancomycin* sehingga dapat ditambahkan sebelum proses sterilisasi dengan autoklaf. Lorian (2005), juga menjelaskan bahwa kerja *chloramphenicol* yaitu menghambat reaksi peptidiltransferase pada sintesis protein bakteri sehingga mencegah terbentuknya formasi ikatan peptida. Kultur ditumbuhkan selama 7 hari hingga miselium tumbuh memenuhi medium. Kultur *Mycelia sterilia* sp.2 LM1041 mempunyai pertumbuhan lebih cepat daripada kultur *Gliomastix* sp.2 LM1020



(Gambar 4.1). Pada hari ke-4, kultur *Mycelia sterilia* sp. 2 LM1041 sudah memenuhi medium pada tabung reaksi. Sedangkan kultur *Gliomastix* sp.2 LM1020, tumbuh penuh di medium pada hari ke-12.



(a)

(b)

Gambar 4.1 Pertumbuhan kultur *Gliomastix* sp.2 (a), dan *Mycelia sterilia* sp.2 (b) pada hari ke-7.

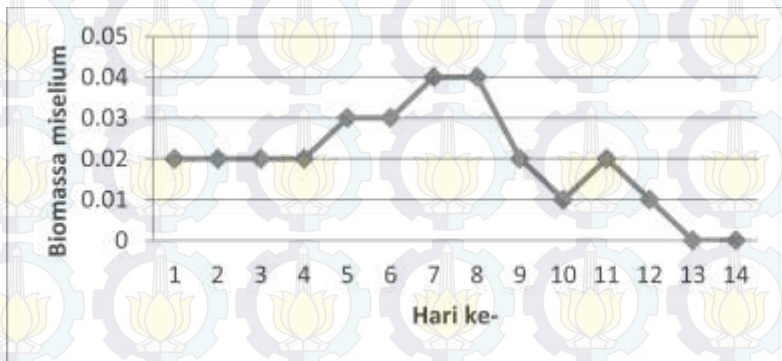
Setelah miselium kedua isolat tumbuh dengan baik, dilakukan pembuatan suspensi inokulum dengan konsentrasi  $10^6$  spora/ml. Berdasarkan hasil enumerasi, dimana kepadatan spora  $10^6$  spora/ml merupakan jumlah yang mewakili, kepadatan tidak terlalu tinggi atau rendah, untuk digunakan sebagai inokulum. Chitara *et al.*, (2004) menyatakan bahwa germinasi spora terhambat ketika kepadatan spora terlalu tinggi. Pada suspensi spora  $10^6$  tingkat germinasi *P. paneum* yaitu sebesar 90%, sedangkan pada suspensi spora  $10^9$  tingkat germinasi hanya 7%.

Medium yang digunakan untuk pengukuran kurva pertumbuhan adalah medium basal cair yang ditambahkan lignin-alkali sebagai sumber karbon. Komposisi medium basal yang digunakan adalah ekstrak khamir,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Ekstrak khamir berperan sebagai sumber nitrogen yang kaya akan berbagai macam asam amino, vitamin dan senyawa lainnya yang dapat menstimulus pertumbuhan (Tuliakova *et al.*, 2006 dalam Hakobyan *et al.*, 2012).  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sebagai sumber fosfat yang masuk ke dalam sel melalui transport aktif ion  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Elemen



Fe, Ca dan Mn dibutuhkan organisme sebagai kofaktor enzim dan protein fungsional lainnya (Carlile *et al.*, 2001). Sedangkan Mg merupakan makroelemen yang digunakan dalam aktivitas enzim dan pembelahan sel (Kavanagh, 2011). Penggunaan medium lignin-alkali ini dimaksudkan supaya kultur dapat beradaptasi dengan baik pada medium yang mengandung lignin seperti pada medium yang nantinya digunakan untuk proses produksi enzim.

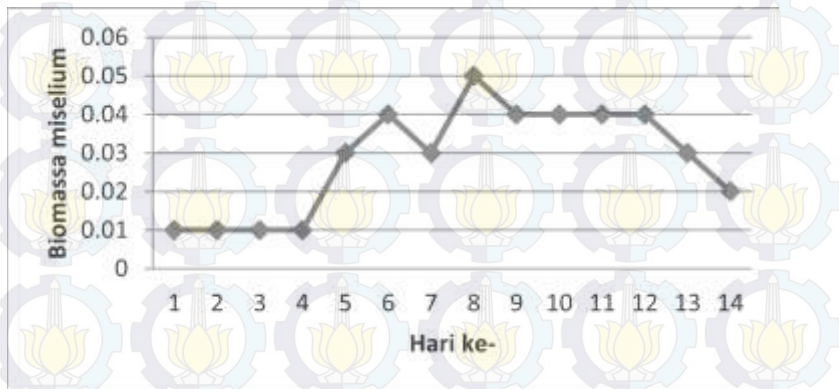
Kurva pertumbuhan *Mycelia sterilia* sp.2 berdasarkan berat kering sel (Gambar 4.2), menunjukkan terjadinya fase lag pada hari ke-1 - 4, dimana belum terjadi pertumbuhan atau disebut fase adaptasi (Melgar *et al.*, 2013), dengan biomassa miselium sebesar 0.02 gram. Kemudian pada hari ke-4 - 7 biomassa meningkat dari 0.02 gram menjadi 0.04 gram. Hal tersebut menunjukkan terjadinya fase eksponensial, yaitu fase pertumbuhan yang terus meningkat dan mencapai kecepatan maksimum (Melgar *et al.*, 2013). Pada hari ke-7 dan ke-8, *Mycelia sterilia* sp.2 menunjukkan fase stasioner, yaitu fase pertumbuhan sel konstan, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Maryanty *et al.*, 2010) dengan biomassa miselium sebesar 0.04 gram. Pada hari ke-8 - 14 pertumbuhan mengalami penurunan yang menunjukkan fase kematian. Menurut Melgar *et al.* (2013), hal ini diperkirakan karena sumber nutrisi pada medium sudah dikonsumsi sehingga ketersediaan nutrisi terbatas.



Gambar 4.2. Kurva Pertumbuhan *Mycelia sterilia* sp.2

Pada pemodelan kurva pertumbuhan, terdapat parameter penting untuk mengetahui kecepatan pertumbuhan maksimum ( $\mu_m$ ) dimana  $\mu_m$  menunjukkan lereng garis (*slope*) ketika organisme tumbuh secara eksponensial (Zwietering *et al.*, 1990). Sehingga diperoleh waktu optimum *Mycelia sterilia* sp. untuk digunakan starter produksi enzim yaitu pada hari ke-5. Stanbury *et al.* (1999) dalam Melgar *et al.* (2013) menyatakan bahwa beberapa enzim disintesis pada fase eksponensial, sementara kebanyakan metabolit sekunder disintesis pada fase stasioner ketika tidak ada penambahan biomassa.

Pada kurva pertumbuhan *Gliomastix* sp.2 (Gambar 4.3) menunjukkan pada hari ke-1 – 4 mengalami fase lag dengan berat biomassa sebesar 0.01 gram. Kemudian pada hari ke-4 – 8 mengalami fase eksponensial dengan biomassa sel mencapai 0.05 gram. Pada hari ke-9 – 12 pertumbuhan mengalami fase stasioner dengan biomassa sel sebesar 0.04 gram dan selanjutnya mengalami penurunan pertumbuhan hingga biomassa sel mencapai 0.02 gram.

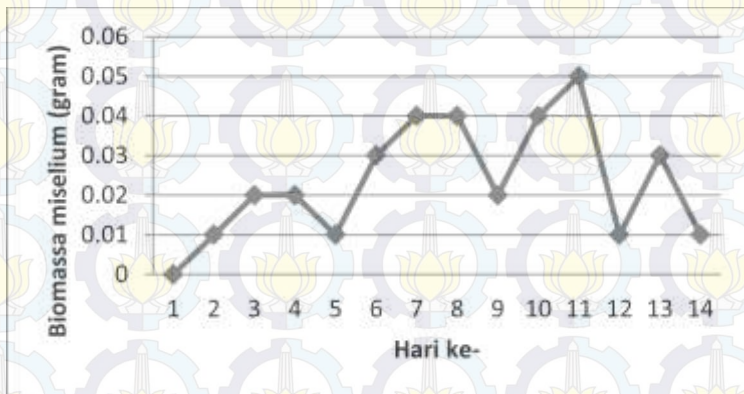


Gambar 4.3. Kurva Pertumbuhan *Gliomastix* sp.2

Penurunan pertumbuhan ini mungkin terjadi karena nutrisi dalam media sudah banyak yang dikonsumsi sehingga mulai menuju ke fase kematian (Melgar *et al.*, 2013). Berdasarkan pola

pertumbuhan tersebut diperoleh waktu optimum *Gliomastix sp.2* untuk digunakan starter produksi enzim yaitu pada hari ke-6.

Konsorsium *Mycelia sterilia sp.2* dan *Gliomastix sp.2* (Gambar 4.4) menunjukkan pola pertumbuhan yang tidak stabil. Fase eksponensial sudah terjadi pada hari ke-1 – 11 dengan biomassa tertinggi yaitu sebesar 0.05gram. Pola pertumbuhan pada konsorsium ini tidak menunjukkan terjadinya fase stasioner. Setelah hari ke-11, pertumbuhan turun hingga mengalami fase kematian. Menurut Melgar *et al.* (2013), ketidakstabilan ini terjadi mungkin karena adanya hasil metabolit yang dihasilkan masing-masing kultur dalam fase pertumbuhan primer sehingga memungkinkan terjadi fase baru pada pertumbuhan fungi.



Gambar 4.4. Kurva Pertumbuhan Konsorsium *Gliomastix sp.2* dan *Mycelia sterilia sp.2*

## 4.2 Produksi Enzim

Tahap produksi enzim dilakukan pada medium fermentasi padat (*Solid State Fermentation/ SSF*). Fermentasi padat diketahui mampu meningkatkan produksi enzim termasuk enzim ligninolitik khususnya pada limbah industri bagase. Menurut Couto & Sanroman (2005), terdapat beberapa keuntungan menggunakan fermentasi padat yaitu dapat memperoleh hasil panen yang tinggi dalam waktu yang singkat, sirkulasi oksigen



sangat baik, merupakan medium yang menyamai habitat asli fungi berfilamen, membutuhkan upaya yang kecil dalam proses *downstream*, dan mikroorganisme strain *wild-type* dapat tumbuh baik pada SSF daripada modifikasi genetik.

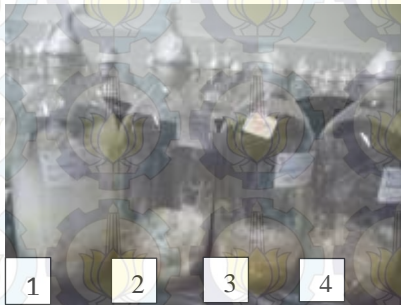
Medium yang digunakan pada tahap produksi enzim adalah bagase yang ditambahkan logam dengan berbagai konsentrasi untuk mengetahui pengaruh logam terhadap aktivitas enzim ligninolitik. Produksi enzim dilakukan selama 30 hari. Parani & Eyini (2012) melaporkan bahwa aktivitas enzim lignin peroksidase dan lakase mencapai nilai tertinggi antara hari ke- 20 dan 30 pada beberapa fungi pelapuk putih, pelapuk coklat dan pelapuk lunak selama proses fermentasi padat.

Pertumbuhan kultur pada bagase diamati secara visual dengan melihat penyebaran miselium fungi di bagian permukaan, pinggir dan bawah botol. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa kultur *Gliomastix* sp. tumbuh lebih cepat dibandingkan dengan *Mycelia sterilia* sp. dan konsorsium. Selain itu struktur miselium pada *Gliomastix* sp. juga lebih kompak dibandingkan dengan *Mycelia sterilia* sp. Perbedaan logam dan variasi konsentrasi yang ditambahkan pada medium produksi, memberikan pengaruh yang spesifik terhadap pertumbuhan miselium kultur *Gliomastix* sp. dan *Mycelia sterilia* sp. baik secara monokultur maupun konsorsium.

Kultur *Gliomastix* sp.2 tumbuh sangat cepat pada penambahan logam Cu, sedangkan pada penambahan Zn sedikit lebih lambat dibandingkan Cu, dan penambahan Mn pertumbuhan lebih lambat daripada Zn dan Cu (Lampiran 5). Pada penelitian McHargue & Calfer (1931) melaporkan bahwa pada masa inkubasi, Cu dapat meningkatkan pertumbuhan sel lebih besar dibandingkan dengan Mn dan Zn. Penambahan Cu menghasilkan berat kering sel lebih besar pada *yeast* yaitu sebesar 0.5915 mg daripada Zn dan Mn, berturut-turut sebesar 0.5364 mg dan 0.4934 mg. Pertumbuhan yang lambat pada penambahan Mn ini diduga karena pengaruh konsentrasi logam yang terlalu tinggi (100, 174, dan 248 $\mu$ M). Hal ini dilihat dari pertumbuhan miselium kontrol



(konsentrasi Mn  $0\mu\text{M}$ ) yang tumbuh baik dibandingkan pada konsentrasi 100, 174, dan  $248\mu\text{M}$  (Gambar 4.5). Menurut Kavanagh (2011), kebutuhan logam Mn untuk pertumbuhan fungi, umumnya untuk *yeast S. cereviceae*, yaitu antara  $2\text{--}4\mu\text{M}$ . Tetapi kisaran ini juga berlaku untuk fungi. Hal ini juga bergantung pada spesies atau strain serta kondisi pertumbuhan. Winkelmann & Winge (1994) juga menambahkan bahwa kebutuhan Mn untuk pertumbuhan fungi sangat bervariasi ( $0.01\text{--}0.005\text{ ppm}$ ). Genus *Chaetomium* menunjukkan pertumbuhan yang sangat rendah ketika diinkubasi pada medium tanpa Mn dan meningkat ketika ditambahkan konsentrasi Mn pada jamur yang berbeda.



Gambar 4.5. Pertumbuhan *Gliomastix* sp. pada konsentrasi Mn  
Keterangan : (1) Mn  $0\mu\text{M}$ , (2) Mn  $100\mu\text{M}$ , (3) Mn  $174\mu\text{M}$ , dan (4)  $248\mu\text{M}$

Baldrian (2003), menyatakan bahwa fungi pelapuk putih membutuhkan logam berat esensial seperti Cd, Mn, dan Zn untuk pertumbuhannya, tetapi logam-logam tersebut bisa menjadi toksik ketika keberadaanya berlebih. Winkelmann & Winge (1994) juga menambahkan bahwa meskipun Mn dibutuhkan sebagai elemen esensial, tetapi pada konsentrasi tinggi juga dapat mengganggu pertumbuhan fungi. Silver & Jasper (1977) dalam Winkelmann & Winge (1994), menjelaskan bahwa konsentrasi Mn tinggi diketahui bisa menjadi mutagenik dan dapat menghambat pertumbuhan pada bakteri dan yeast. Seehaus

(1990) dalam Winkelmann & Winge (1994), juga menjelaskan bahwa respon stres *A. niger* pada konsentrasi Mn yang tinggi adalah dengan mengurangi ukuran dan jumlah vakuola sehingga menampakan sitoplasma yang homogen.

Pada medium tanpa penambahan logam, miselium kultur *Gliomastix* sp.2 dan *Mycelia sterilia* sp.2 tumbuh dengan sangat cepat (Gambar 4.6). Hal ini diperkirakan kedua kultur tersebut merupakan fungi oligotrofik. Menurut Kavanagh (2005) beberapa fungi merupakan oligotrofik, yang tumbuh pada suplai nutrisi yang rendah. Pertumbuhan miselium konsorsium cenderung lebih lambat (Lampiran 6) dibandingkan dengan kultur tunggal *Gliomastix* sp. dan *Mycelia sterilia* sp. Pada kontrol (tanpa isolat) tidak terdapat pertumbuhan miselium (Lampiran 5).



Gambar 4.6 Pertumbuhan miselium tanpa Logam

### 4.3 Aktivitas Enzim

Tahap awal yang dilakukan untuk menguji aktivitas enzim adalah pembuatan *crude* enzim dari medium bagase. *Crude* enzim dibuat dengan melarutkan medium fermentasi padat menggunakan buffer fosfat pH 7. Menurut Coligan *et al.* (2004), buffer dibutuhkan untuk menjaga kestabilan enzim dari pH dan kekuatan ionik. Kapasitas buffer yang cukup harus digunakan untuk memastikan pH tidak mengalami penurunan dibawah

kisaran pH protein. Scopes (2002) juga menambahkan, enzim aktif pada kisaran pH tertentu, antara 5 hingga 10. Dalam rentang tersebut, terdapat pH optimum untuk aktivitas enzim maksimum. Aktivitas enzim juga dapat dipengaruhi oleh sifat buffer yang digunakan. Setelah itu, dilakukan sentrifugasi hingga diperoleh natan dan supernatan. Garg (2013) menjelaskan bahwa proses sentrifugasi berfungsi untuk memisahkan enzim dan sel fungi.

Pada pengujian enzim LiP digunakan veratril alkohol sebagai substrat enzim. Menurut Mester *et al.* (1995), veratril alkohol merupakan hasil metabolit sekunder yang penting dalam sistem ligninolitik. Selain itu, pada beberapa substrat untuk LiP seperti benzola[ $\alpha$ ]pyrene, pewarna azo, poly R-478 dan lignin, veratril alkohol berperan penting sebagai kosubstrat untuk mengkatalis reaksi secara *in vitro*. Veratril alkohol bertanggung jawab dalam menjalankan siklus enzim (dengan mereduksi senyawa II), yang memungkinkan dapat meningkatkan oksidasi substrat non-fenolik. Menimbang bahwa veratril alkohol diproduksi secara endogen bersama dengan LiP dan mempunyai peranan fisiologis secara *in vivo* dan *in vitro*, sehingga digunakan sebagai kofaktor fisiologis LiP.

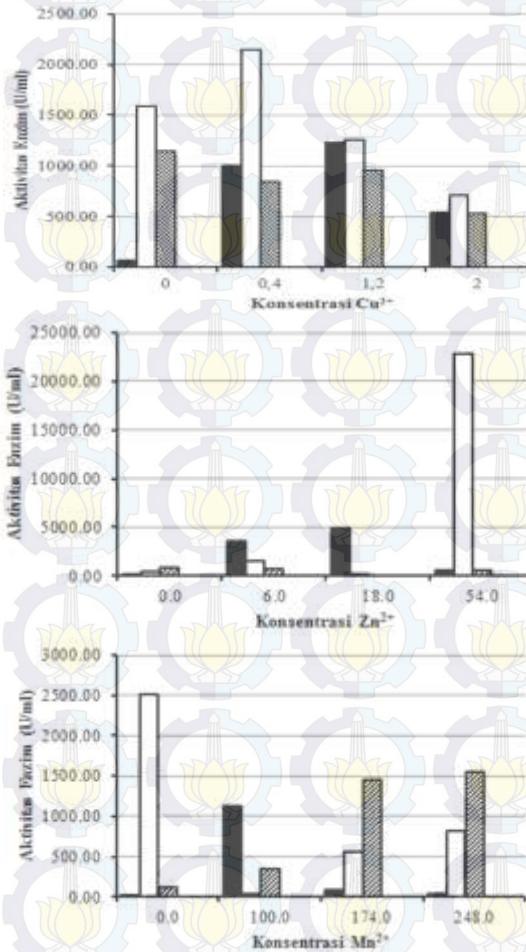
Aktivitas Mnp diuji dengan penambahan substrat guaiakol,  $\text{H}_2\text{O}_2$  dan asam laktat. Mabrouk *et al.* (2010), menyebutkan bahwa oksidasi guaiakol merupakan uji kualitatif yang paling baik untuk produksi enzim ligninolitik pada beberapa fungi. Menurut Asgher *et al.* (2008)  $\text{H}_2\text{O}_2$  berperan dalam mengoksidasi  $\text{Mn}^{2+}$  menjadi  $\text{Mn}^{3+}$  yang sangat reaktif. Setelah itu, reaksi akan stabil melalui pengkhelatan dengan asam dikarboksilat (seperti asam laktat) menjadi bentuk  $\text{Mn}^{3+}$  - kompleks asam dikarboksilat. Kompleks tersebut merupakan oksidan yang sangat reaktif yang dapat menembus pusat aktif enzim karena memiliki berat molekul yang rendah.

Pada pengujian aktivitas lakase digunakan ABTS sebagai mediator enzim. Madhavi & Lele (2009) menjelaskan bahwa mekanisme mediator oleh ABTS yaitu oksigen akan mengaktifkan lakase, dan mediator akan teroksidasi oleh enzim.



Mediator yang teroksidasi tersebut akan berdifusi ke dalam pulp dan mengoksidasi lignin.

#### 4.3.1 Pengaruh logam terhadap Aktivitas Enzim Ligninolitik *Gliomastix* sp.



Gambar 4.7 Aktivitas Enzim Ligninolitik *Gliomastix* sp.

Keterangan : ■ LiP, □ MnP, ▨ Lakase, ▩ Selulase, ▤ Xilanase



Pengaruh  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik *Gliomastix* sp, semakin tinggi konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$ , aktivitas enzim LiP semakin tinggi, sedangkan aktivitas MnP dan lakase semakin turun. Aktivitas enzim ligninolitik tertinggi didominasi oleh MnP dimana mempunyai aktivitas tertinggi pada konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  0.4  $\mu\text{M}$ , sebesar 2149.91U/ml. Menurut Lebrun *et al.* (2011),  $\text{Cu}^{2+}$  juga dapat meningkatkan produksi MnP meskipun bukan elemen pembangun enzim tersebut. Aktivitas enzim LiP optimum pada konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  1.2  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 1226.11 U/ml. Singhal & Rathore (2001) melaporkan bahwa aktivitas LiP pada *P. cryosporium* juga optimum pada konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  1.2  $\mu\text{M}$ , sebesar 0.089 $\text{min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$ . Sedangkan aktivitas enzim lakase tertinggi pada konsentrasi 0 $\mu\text{M}$  (kontrol) sebesar 1144.29 U/ml. Hal ini bertolak belakang dengan pernyataan Baldrian (2003) yang menyatakan bahwa  $\text{Cu}^{2+}$  dapat meningkatkan produksi lakase pada fungi yang berbeda. Menurut Piscitelli *et al.* (2011) sintesis dan sekresi lakase dipengaruhi oleh tingkat nutrisi, kondisi kultur, dan fase perkembangan serta penambahan induker ke dalam media kultur dengan variasi antar fungi yang berbeda. Gianfreda *et al.* (1999) juga menambahkan, produksi lakase dipengaruhi oleh konsentrasi nitrogen dalam media. Tingkat nitrogen yang tinggi biasanya dibutuhkan untuk menghasilkan enzim lakase dalam jumlah besar.

Pengaruh  $\text{Zn}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik *Gliomastix* sp. yaitu semakin tinggi konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$ , aktivitas LiP dan lakase semakin menurun, sedangkan aktivitas MnP semakin meningkat. Enzim MnP mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan enzim ligninolitik lainnya yang terjadi pada konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  54  $\mu\text{M}$  sebesar 22885U/ml, 51% lebih tinggi dibandingkan kontrol (Gambar 4.7). LiP tertinggi yaitu pada konsentrasi 18  $\mu\text{M}$ , sebesar 4910U/ml. Sedangkan lakase tertinggi pada konsentrasi 0  $\mu\text{M}$ , sebesar 865U/ml. Selulase dan xilanase tidak ada aktivitas enzim. Pada penelitian Singhal & Rathore (2001), melaporkan bahwa aktivitas MnP *P. cryosporium* meningkat secara kontinyu seiring dengan peningkatan  $\text{Zn}^{2+}$ . Pada

konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  tinggi, aktivitas enzim meningkat sekitar 77% dibandingkan dengan konsentrasi terendah.

Pengaruh  $\text{Mn}^{2+}$  terhadap aktivitas enzim ligninolitik *Gliomastix* sp. yaitu semakin tinggi konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$ , aktivitas LiP dan MnP semakin menurun, sedangkan aktivitas lakase semakin meningkat. Pada kultur *Gliomastix* sp. ini, MnP mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan dengan enzim ligninolitik lainnya, pada konsentrasi 0  $\mu\text{M}$ . Tekere *et al.* (2001), melaporkan bahwa pada penambahan  $\text{Mn}^{2+}$  terhadap kultur *P. eryngii*, *P. ostreatus*, dan *P. radiata* tidak meningkatkan aktivitas MnP. Penelitian Patrick *et al.* (2011) juga melaporkan bahwa aktivitas MnP meningkat pada medium kultur tanpa  $\text{Mn}^{2+}$  untuk *P. sajor-caju*. Hal ini membuktikan bahwa pada beberapa fungi pelapuk putih membutuhkan  $\text{Mn}^{2+}$  untuk ekspresi MnP maksimum, tetapi pada beberapa fungi juga tidak membutuhkannya.

Berdasarkan hasil uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha < 0.05$ ) terdapat pengaruh yang signifikan terhadap penambahan logam pada kultur *Gliomastix* sp. khususnya pada aktivitas LiP. Aktivitas LiP tertinggi yaitu pada penambahan  $\text{Zn}^{2+}$  konsentrasi 6  $\mu\text{M}$  (GZ1), sebesar 3608 U/ml (Tabel 4.1). Pada penambahan logam Cu tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim LiP, MnP dan lakase. Pada penambahan logam Zn terdapat pengaruh yang signifikan pada aktivitas LiP yaitu pada kontrol (GZ0) dengan penambahan Zn konsentrasi 18  $\mu\text{M}$  (GZ2). Sedangkan pada penambahan logam Mn tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas LiP, MnP, dan lakase. Pada penelitian ini juga dilakukan pengukuran terhadap aktivitas enzim selulase dan xilanase yang digunakan sebagai kontrol untuk memastikan bahwa enzim yang diperoleh adalah enzim ligninolitik (LiP, MnP, dan lakase).

Tabel 4.1 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik *Gliomastix* sp.

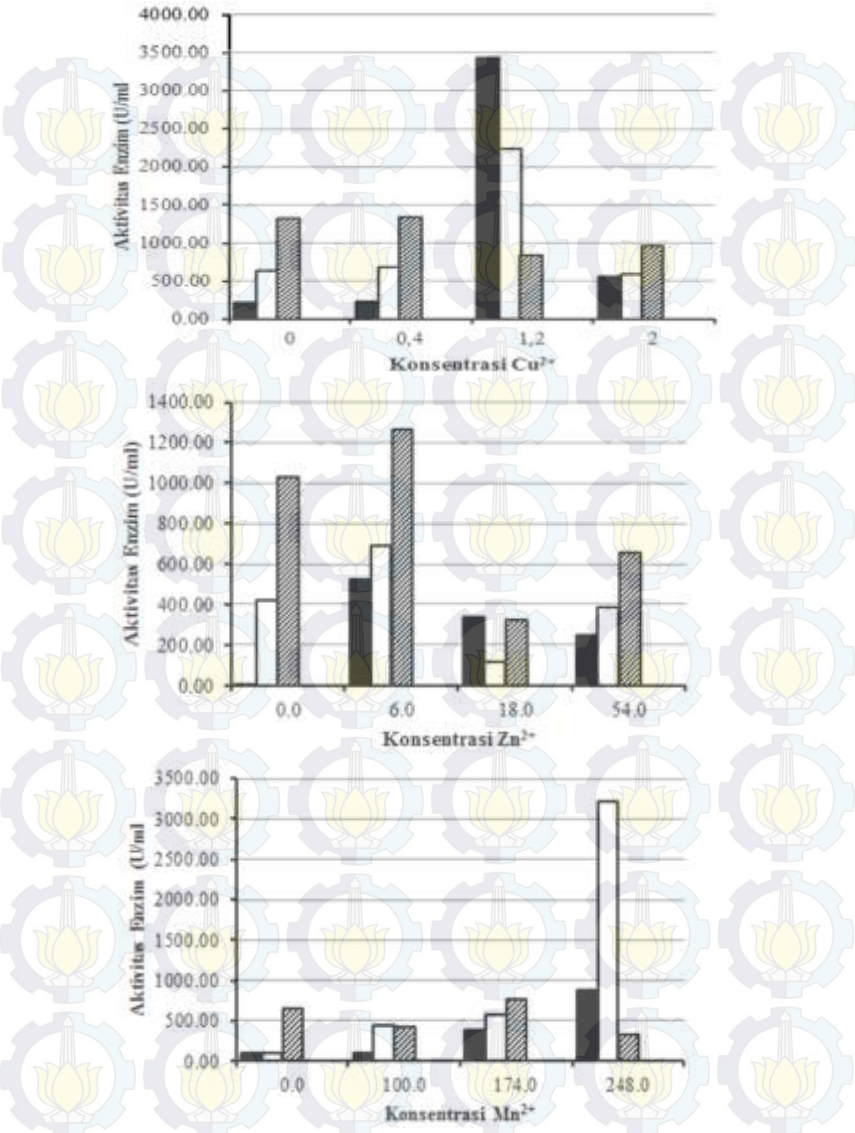
Perlakuan	Aktivitas Enzim				
	LiP	MnP	Lakase	Selulase	Xilanase
GC0	96b	1884a	1144a	0a	0a
GC1	1001ab	2150a	899a	0a	0a
GC2	1227ab	1919a	963a	2a	0a
GC3	1023ab	1205a	540a	3a	0a
GZ0	109b	450a	698a	0a	0a
GZ1	3608ab	1271a	721a	0a	0a
GZ2	4910a	192a	357a	0a	0a
GZ3	570ab	22886a	557a	0a	0a
GM0	181b	2740a	126.5a	0a	0a
GM1	1131ab	387a	430a	0a	0a
GM2	365ab	564a	614a	4a	0a
GM3	120b	819a	848a	0a	0a

Keterangan : nilai rata – rata yang diikuti angka yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.

#### 4.3.2 Pengaruh logam terhadap Aktivitas Enzim Ligninolitik *Mycelia sterilia* sp.

Pengaruh logam  $\text{Cu}^{2+}$  terhadap aktivitas ligninolitik *Mycelia sterilia* sp. yaitu semakin tinggi konsentrasi Cu, aktivitas enzim LiP dan MnP semakin meningkat, sedangkan aktivitas lakase mengalami penurunan (Gambar 4.8). Dari ketiga enzim tersebut, aktivitas LiP mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan dengan MnP dan lakase. Sedangkan lakase memiliki aktivitas terendah dibandingkan dengan enzim ligninolitik yang lain, tetapi mempunyai respon yang baik pada setiap konsentrasi  $\text{Cu}^{2+}$  (aktivitas stabil). Piscitelli *et al.* (2011) menyatakan bahwa pada logam yang sama dapat memberi efek yang berlawanan pada berbagai spesies fungi.





Gambar 4.8 Aktivitas Enzim Ligninolitik *Mycelia sterilia* sp.  
Keterangan : ■ LiP, □ MnP, ▨ Lakase, ▩ Selulase, ▤ Xilanase.



Pengaruh logam Zn terhadap aktivitas ligninolitik *Mycelia sterilia* sp. yaitu semakin tinggi konsentrasi Zn, aktivitas LiP, MnP dan lakase semakin menurun. Aktivitas enzim ligninolitik *Mycelia sterilia* sp. optimum pada konsentrasi  $\text{Zn}^{2+}$  6  $\mu\text{M}$  (Gambar 4.8). Enzim LiP mempunyai aktivitas sebesar 525 U/ml. Enzim MnP mempunyai aktivitas sebesar 689 U/ml. Sedangkan aktivitas lakase sebesar 1269 U/ml. Pada kultur *Mycelia sterilia* sp., lakase mempunyai aktivitas enzim tertinggi dibandingkan enzim ligninolitik lainnya. Rutherford & Bird (2004), menjelaskan bahwa zink (Zn) merupakan pusat katalitik pada beberapa enzim dan mempunyai peran struktural yang penting pada beberapa protein. Zhao *et al.* (2012) juga menambahkan bahwa Zn juga mampu meningkatkan aktivitas enzim lakase secara signifikan pada konsentrasi 25mM, 122%. Aktivitas enzim LiP, MnP, dan lakase menurun setelah mencapai aktivitas optimum. Menurut Brown *et al.* (1990) aktivitas enzim menurun karena menurunnya stabilitas RNA atau protein atau terjadi inaktivasi enzim.

Pengaruh logam Mn terhadap aktivitas ligninolitik *Mycelia sterilia* sp. yaitu semakin tinggi konsentrasi Mn, aktivitas enzim ligninolitik, LiP, MnP dan lakase juga semakin meningkat. aktivitas LiP dan MnP tertinggi yaitu pada konsentrasi 248  $\mu\text{M}$ , berurutan sebesar 878 U/ml dan 3225 U/ml (Gambar 4.16). Sedangkan aktivitas lakase tertinggi pada konsentrasi 174  $\mu\text{M}$  dengan nilai 771 U/ml. Dalam hal ini, MnP mempunyai aktivitas tertinggi dibandingkan dengan enzim ligninolitik yang lainnya. Menurut Tekere *et al.* (2001), peningkatan konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$  diketahui dapat meningkatkan aktivitas MnP.  $\text{Mn}^{2+}$  mengatur produksi MnP dengan menginduksi transkripsi gen. Tingkat MnP mRNA, MnP protein dan aktivitas MnP pada *P. cryosporium* meningkat dengan bertambahnya konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$ . Bennett & Lasure (1991) menjelaskan bahwa akumulasi aktivitas MnP pada medium ekstraseluler dengan nitrogen terbatas bergantung pada kehadiran Mn. Western blot protein ekstraseluler dan intraseluler *P. cryosporium* menunjukkan bahwa protein MnP terbentuk

pada medium nitrogen terbatas dengan adanya Mn. Penelitian Brown *et al.* (1990) melaporkan bahwa tidak ada *mnp* mRNA yang terdeteksi pada kultur yang kekurangan Mn. Hanya dengan penambahan Mn dapat membentuk protein MnP. Regulasi Mn terhadap aktivitas MnP yaitu logam Mn akan membentuk kompleks dengan DNA-binding protein spesifik. Ion logam akan mengaktifkan gen transkripsi MnP.

Tabel 4.2 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik *Mycelia sterilia* sp.

Perlakuan	Aktivitas Enzim				
	LiP	MnP	Lakase	Selulase	Xilanase
MC0	218ab	639b	1321a	0a	0a
MC1	238ab	690b	1346a	0a	0a
MC2	3433a	2238ab	847a	0a	0a
MC3	345ab	586b	967a	0a	0a
MZ0	39b	418b	560a	0a	0a
MZ1	525ab	689b	1269a	0a	0a
MZ2	392ab	115b	325a	0a	0a
MZ3	1029ab	388b	60a	0a	0a
MM0	107b	106b	655a	0a	0a
MM1	95b	452b	417a	0a	0a
MM2	398ab	592b	488a	0a	0a
MM3	1141ab	3225a	425a	0a	0a

Keterangan : nilai rata – rata yang diikuti angka yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.

Berdasarkan hasil uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha < 0.05$ ) diketahui bahwa penambahan logam memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim LiP dan MnP pada kultur *Mycelia sterilia* sp. Pada penambahan Cu dan Zn tidak terdapat pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas ligninolitik *Mycelia sterilia* sp. Sedangkan pada penambahan Mn

terdapat pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim MnP yaitu pada kontrol (MM0) dan penambahan konsentrasi Mn 248  $\mu\text{M}$  (MM3).

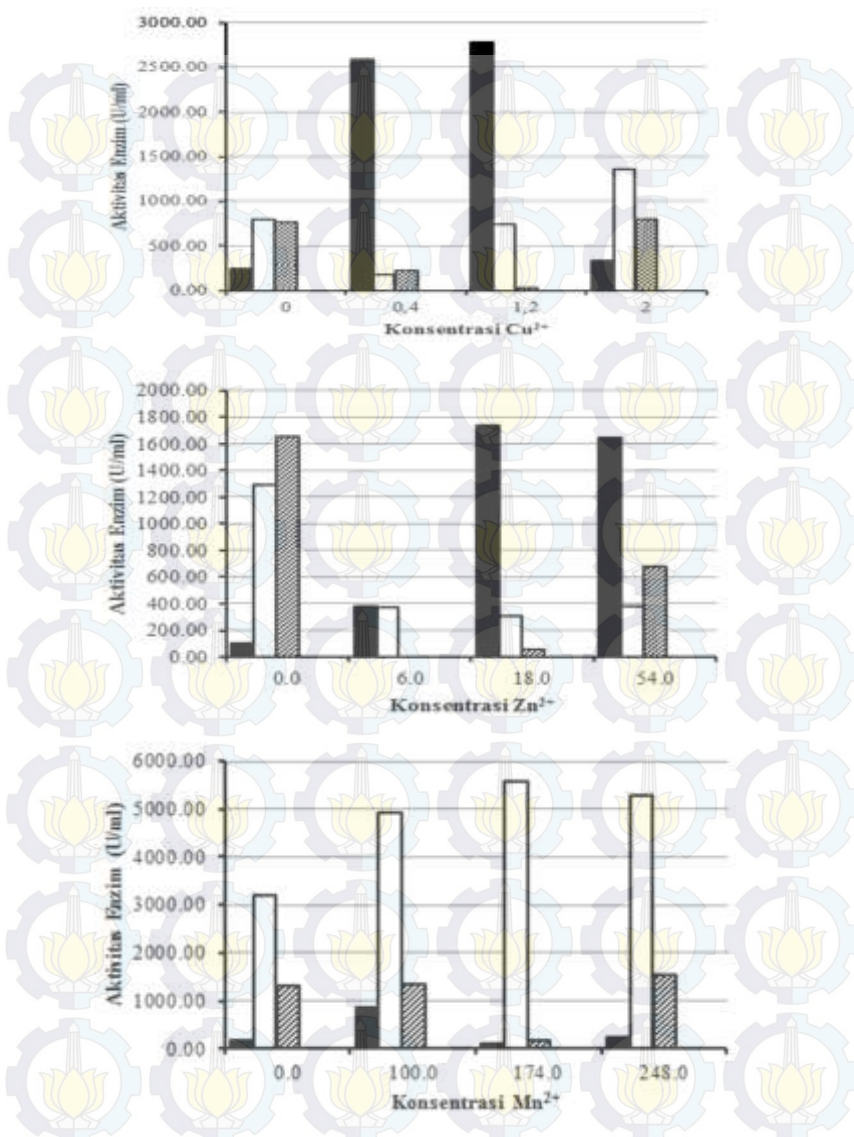
#### **4.3.3 Pengaruh logam terhadap Aktivitas Enzim Ligninolitik konsorsium**

Pengaruh logam Cu terhadap aktivitas ligninolitik kultur konsorsium yaitu, semakin tinggi konsentrasi logam, aktivitas enzim LiP, MnP, dan lakase juga meningkat (Gambar 4.9). Pada konsorsium, aktivitas enzim LiP lebih mendominasi daripada aktivitas enzim ligninolitik lainnya. Aktivitas LiP meningkat pada konsentrasi 1.2  $\mu\text{M}$  sebesar 2783 U/ml (Gambar 4.9). Peningkatan terjadi sebesar 11.2 kali lipat dibandingkan dengan kontrol (0  $\mu\text{M}$ ). Berbeda dengan LiP, aktivitas MnP tertinggi yaitu pada konsentrasi 2  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 617U/ml. Hal yang sama juga terjadi pada lakase yang mempunyai aktivitas tertinggi pada konsentrasi 2  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 802  $\mu\text{M}$ . Aktivitas selulase dan xilanase tidak terdeteksi.

Pengaruh logam Zn terhadap aktivitas ligninolitik kultur konsorsium yaitu, semakin tinggi konsentrasi Zn, aktivitas LiP semakin meningkat sedangkan aktivitas MnP dan lakase semakin menurun. Aktivitas LiP tertinggi yaitu pada konsentrasi 18  $\mu\text{M}$ , sebesar 1735 U/ml. Aktivitas MnP tertinggi terjadi pada konsentarsi 0  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 1294 U/ml. Aktivitas lakase tertinggi yaitu pada konsentrasi 0  $\mu\text{M}$ , sebesar 1656 U/ml.

Pengaruh logam Mn terhadap aktivitas ligninolitik kultur konsorsium yaitu, semakin tinggi konsentrasi Mn, aktivitas LiP semakin menurun sedangkan aktivitas MnP dan lakase emain meningkat. Aktivitas enzim ligninolitik pada konsorsium lebih didominasi oleh MnP (Gambar 4.9).





Gambar 4.9 Aktivitas Enzim Ligninolitik konsorsium.

Keterangan : ■ LiP, □ MnP, ▨ Lakase, ▩ Selulase, ▤ Xilanase.



Aktivitas LiP tertinggi pada konsentrasi 100  $\mu\text{M}$  yaitu sebesar 852 U/ml. Aktivitas MnP tertinggi pada konsentrasi 174  $\mu\text{M}$ , sebesar 2538 U/ml dan aktivitas lakase tertinggi yaitu pada konsentrasi 248  $\mu\text{M}$ , sebesar 1532 U/ml. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa setiap konsentrasi  $\text{Mn}^{2+}$  berpotensi meningkatkan aktivitas enzim ligninolitik pada konsorsium *Mycelia sterilia* sp. dan *Gliomastix* sp. Penambahan logam Mn yang diketahui dapat memicu aktivitas enzim MnP dapat dilihat pada aktivitas enzim MnP yang terus meningkat seiring bertambahnya konsentrasi Mn. Meskipun pada konsentrasi 248 $\mu\text{M}$  mengalami penurunan.

Tabel 4.3 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik Konsorsium

Perlakuan	Aktivitas Enzim				
	LiP	MnP	Lakase	Selulase	Xilanase
KC0	335b	792bc	1076a	0a	0a
KC1	2587ab	730bc	225a	0a	0a
KC2	2784ab	735bc	141a	0a	0a
KC3	4026a	1357bc	802a	0a	0a
KZ0	132b	1294bc	214a	0a	0a
KZ1	935b	371c	14a	0a	0a
KZ2	1735ab	303c	28a	0a	0a
KZ3	1646ab	548bc	722a	0a	0a
KM0	167b	3207abc	1301a	0a	0a
KM1	323b	3919ab	679a	0a	0a
KM2	115b	5575a	1064a	0a	0a
KM3	367b	5292a	827a	0a	0a

Keterangan : nilai rata – rata yang diikuti angka yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5% .

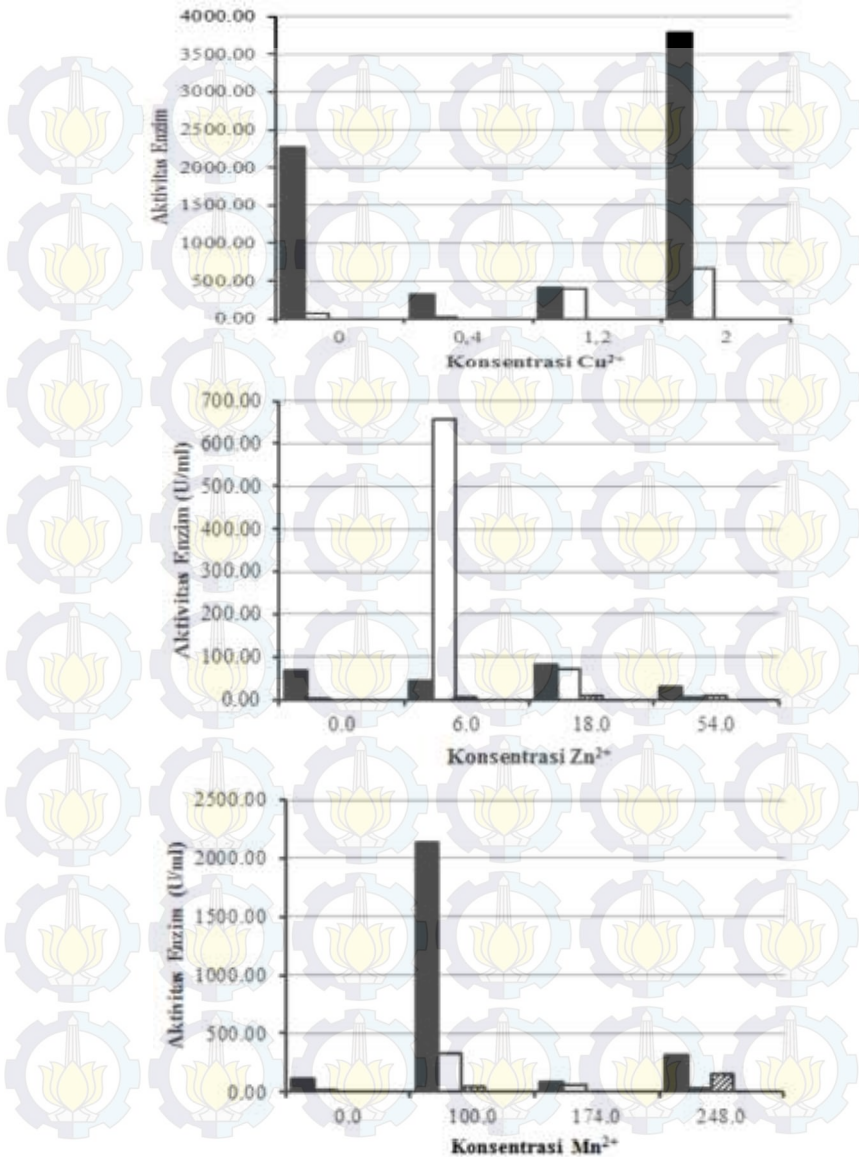
Berdasarkan hasil uji ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha < 0.05$ ) diketahui bahwa penambahan logam memberikan pengaruh yang signifikan terhadap aktivitas enzim LiP dan MnP.

Pada penambahan Cu, aktivitas LiP kontrol (KC1) berbeda signifikan dengan penambahan Cu konsentrasi 2 $\mu$ M. Aktivitas LiP semakin meningkat pada konsentrasi Cu tinggi. Selain itu, aktivitas MnP dengan penambahan Zn berbeda signifikan dengan penambahan Mn.

#### **4.3.4 Pengaruh logam terhadap Aktivitas Enzim Ligninolitik kontrol (tanpa isolat)**

Pada medium kontrol (tanpa isolat) menunjukkan adanya aktivitas ligninolitik baik pada penambahan logam Cu, Zn, dan Mn (Gambar 4.10). Adanya aktivitas ligninolitik ini diduga karena beberapa faktor seperti faktor fisik dan kimia. Faktor fisik dapat berupa kocokan dari proses sentrifugasi yang dapat menyebabkan struktur lignin pada bagase terputus. Sedangkan faktor kimia seperti perubahan suhu dan pH ketika dilakukan uji aktivitas enzim. Penurunan konsentrasi poly R-478 disebabkan oleh faktor fisik dan kimia seperti pemanasan, perubahan pH dan agitasi. Dimana Moreira *et al* (2004) menjelaskan bahwa penurunan konsentrasi dari Poly R-478 merupakan tanda adanya proses peroksidase dan oksidase oleh MnP dan lakase.

Berdasarkan hasil uji ANOVA (Tabel 4.4) dengan taraf kepercayaan 95% ( $\alpha < 0.05$ ), meskipun pada medium tanpa isolat terdapat aktivitas ligninolitik akan tetapi tidak terdapat pengaruh yang signifikan pada aktivitas LiP dan lakase. Aktivitas MnP terdapat pengaruh yang signifikan yaitu pada penambahan logam Cu konsentrasi 0.4 $\mu$ M dan konsentrasi 1.2 $\mu$ M.



Gambar 4.9 Aktivitas Enzim Ligninolitik kontrol (tanpa isolat).

Keterangan : ■ LiP, □ MnP, ▨ Lakase, ▤ Selulase, ▩ Xilanase.

Tabel 4.4 Hasil Uji ANOVA Aktivitas Enzim Ligninolitik Kontrol (tanpa isolat)

Perlakuan	Aktivitas Enzim				
	LiP	MnP	Lakase	Selulase	Xilanase
TC0	2272a	64.3b	1.7a	0a	0a
TC1	417a	52.8b	13.1a	0a	0a
TC2	408a	1231a	12.4a	2a	0a
TC3	3790a	669ab	3.7a	3a	0a
TZ0	67a	3b	0.4a	0a	0a
TZ1	63a	657ab	9.1a	0a	0a
TZ2	179a	70b	10a	0a	0a
TZ3	31a	7b	10.2a	0a	0a
TM0	178a	14b	1.4a	0a	0a
TM1	63a	329b	39.4a	0a	0a
TM2	85a	100b	0.8a	4a	0a
TM3	311a	25b	17.6a	0a	0a

Keterangan : nilai rata – rata yang diikuti angka yang sama adalah tidak berbeda nyata pada uji DMRT 5%.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa :

1. Pada induksi logam  $\text{Cu}^{2+}$ , aktivitas LiP dan MnP tertinggi yaitu pada *Mycelia sterilia* sp. dengan konsentrasi induser 1,2  $\mu\text{M}$ . Aktivitas lakase juga tertinggi pada *Mycelia sterilia* sp. dengan konsentrasi 0,4  $\mu\text{M}$ .
2. Pada penambahan  $\text{Cu}^{2+}$ , kultur tunggal *Mycelia sterilia* sp. mempunyai aktivitas enzim ligninolitik tertinggi daripada *Gliomastix* sp. dan konsorsium
3. Pada induksi logam  $\text{Zn}^{2+}$ , aktivitas LiP dan MnP tertinggi yaitu pada *Gliomastix* sp. yaitu berurutan pada konsentrasi 18  $\mu\text{M}$  dan 54  $\mu\text{M}$ . Sedangkan aktivitas lakase tertinggi yaitu pada konsorsium dengan konsentrasi induser 0  $\mu\text{M}$ .
4. Pada penambahan  $\text{Zn}^{2+}$ , kultur tunggal *Gliomastix* sp. mempunyai aktivitas enzim ligninolitik tertinggi daripada *Mycelia sterilia* sp. dan konsorsium
5. Pada induksi  $\text{Mn}^{2+}$ , aktivitas LiP tertinggi pada *Gliomastix* sp. dengan konsentrasi induser 100  $\mu\text{M}$ . Aktivitas MnP tertinggi yaitu pada konsorsium (174  $\mu\text{M}$ ) dan aktivitas lakase tertinggi yaitu pada *Gliomastix* sp. (248  $\mu\text{M}$ ).
6. Pada penambahan  $\text{Mn}^{2+}$ , kultur tunggal *Gliomastix* sp. mempunyai aktivitas enzim ligninolitik tertinggi daripada *Mycelia sterilia* sp. dan konsorsium.

## 5.2 Saran

1. Pada penelitian selanjutnya, pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan menambahkan substrat enzim langsung pada kultur
2. Perlu dilakukan pengujian terhadap jumlah produksi enzim
3. Perlu adanya penelitian terhadap stabilitas enzim ligninolitik pada medium dan induser yang sama.

## DAFTAR PUSTAKA

Ahmed, F.Md., Rahman, S.R. and Gomes, D.J. 2012. Saccharification of Sugarcane Bagasse by Enzymatic Treatment for Bioethanol Production. **Malaysian Journal of Microbiology** Vol. 8(2). Pp. 97-103.

Akhtar M., Blanchette, R.A. and Kirk, T.K. 1997. Fungal Delignification and Biomechanical Pulping of wood. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, 57:159-195.

Anderson,W., and Akin, D.E. 2008. Structural and Chemical Properties of Grass Lignocelluloses related to Conversion for Biofuels. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 35:355-366.

Arora, D.K., Rai, B. Mukerji, K.G and Knudsen, G.R 1991. **Handbook of Applied Mycology : Soil and Plants**. Marcel Dekker, Inc.

Arora, D.S., and Gill, P.K.2001. Comparison of Two Assay Procedure for Lignin Peroxidase. **Enzymes and Microbial Technology** 28.

Asgher, M., Bhatti, H.N., Ashraf, M., and Legge, R.L.2008. Recent Developments in Biodegradation of Industrial Pollutants by White Rot Fungi and their Enzyme System. **Biodegradation**, 19: 771-783.

Astri, N.S., and Sharma, S.K. 2011. Quality Estimation of Cellulases and Lignin Modifying Enzymes in Five Wild *Lentinus* Species Selected from North West India. **Academic Journal of Plant Sciences** 4 (4):105-109.

Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popovic, M.K., Bajpai, R., Stahl, U. 2010. Relevance of Microbial Co-culture Fermentations in Biotechnology. **Journal of Applied Microbiology** 109:371–87.

Baldrian, P. 2003. Interaction of Heavy Metals with White-rot Fungi. **Enzyme Microbial Technology**. 32: 78-91.

Bennett, J.W. and Lasure, L.L. 1991. **More Gene Manipulations in Fungi**. Californis: Academic Press, Inc.

Bollag J-M, Leonowicz A.1984. Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases. **Appl Environ Microbiol** 48:849–854.

Brown, J.C. 1958. *Gliomastix guttuliformis* Sp.Nov. **Trans Britania Mycology Society**. 41, 499-500.

Brown, J.A., Glenn, J.K., and Gold, M.H. 1990. Manganese Regulates Expression of Manganese Peroxidase by *Phanerochaetes chrysosporium*. **Journal of Bacteriology**. Vol.172.No.6.

Brunow, G. 2001. **Methods to Reveal the Structure of Lignin**. In: Steinbuchel A, Hofrichter M, editors. Biopolymers Vol. 1- Lignin, humic substances and coal.p.89-116. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

Carlile, M.J., Watkinson, S.C., and Gooday, G.W. 2001. **The Fungi 2<sup>th</sup> edition**. London: Elsevier Ltd.

Castillo, M.P., Ander, P. and Stenstroem, J. 1997. Lignin and Manganese Peroxidase Activity in Extracts from Straw Solid Substrate Fermentation. **Biotechnology and Technology** 11(9): 701-706.



Chang, S., and Miles, P.G. 2004. **Mushroom: Cultivation, Nutritional Value, Medical Effect, and Environmental Impact** 2<sup>th</sup> edition. Florida: CRC Press.

Chitara, G.S., Abee, T., Rombouts, F.M., Posthumus, M.A., and Dijksterhuis, J. 2004. Germination of *Penicillium paneum* Conidia is Regulated by 1-Octen-3-ol, a Volatil Self-Inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 70, No.5. p. 2823-2829.

Coligan, J.E., Dunn, B.M. Speicher, D.W., and Wingfield, P. 2004. **Current Protocol in Protein Science Extraction of Protein from Plant Tissues**. John Wiley & Sons, Inc.

Couto, S.R., and Sanroman M.A. 2005. Application of Solid-state Fermentation to Ligninolytic Enzyme Production. **Biochemical Engineering Journal** 22. 211-219.

Cupul, W.C., Abarca, G.H., Carrera, D.M. and Vazquea, R.R. 2014. Enhancment of Ligninolytic Enzymme Activities in A *Trametes maxima*-*Paecilomyces carneus* Co-culture: Key Factors Revealed after Screening Using a Plackett-Burman Experimental Design. **Electronic Journal of Biotechnology** 17: 114-121.

Deacon, J. 2005. **Wood Decay, and Wood-Rotting Fungi**. <<http://archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/woodrots.htm>> [9 Februari 2015].

Dinar, F. 2010. Teknik pengolahan Kentang menjadi Dodol Kentang untuk Meningkatkan Penghasilan Keluarga di Desa Garingging, Kec. Merek Kab. Tanah Karo. **Jurnal Pengabdian Masyarakat** Vol. 16 No. 59.

Dong, Y., Wang, W., Hu, Z., Fu, M. and Chen, Q. 2012. The Synergistic Effect on Production of Lignin-modifying Enzymes

Through Submerged Co-cultivation of *Plebia radiata*, *Dichomitus squalens*, and *Ceriopsis subvermispora* using Agricultural Residues. **Bioprocess Biosystematic Engineering** Vol. 35:751-760.

Doran, J.B., Aldrich, H.C. and Ingram, L.O. 1994. Saccharification and Fermentation of Sugar Cane Bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2 Containing Chromosomally Integrated Genes Encoding the *Zymomonas mobilis* Ethanol Pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, Vol. 44:240-247.

Dwivedi, P., Vivekanand, V., Pareek, N., Sharma, A. and Singh, R.P. 2011. Co-cultivation of Mutant *Penicillium oxalicum* SAUE-3.510 and *Pleurotus ostreatus* for Simultaneous Biosynthesis of Xylanase and Laccase under Solid-State Fermentation. **New Biotechnology** 28:616–26.

Fatriasari, W., Ermawar, R.A., Falah, F., Yanto, D.H.Y. dan Hermiati, E. 2009. Pulping Soda Panas Terbuka Bambu Betung dengan Praperlakuan Fungi Pelapuk Putih (*Pleurotus ostreatus* dan *Trametes versicolor*). **Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Hutan**. 2(2):45-50. UPT Balai Penelitian dan Pengembangan Biomaterial. LIPI.

Fengel, D. and Wegener, G. 1984. **Wood Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter & Co.

Fengel, D. dan Wegener G. 1995. **Kayu Kimia, Ultrastruktur, Reaksi-reaksi**. Terjemahan. Yogyakarta: Gadjah Mada University Press.

Fernandez J.L.M. 2011. Laccase from New Fungal Source and some Promising Applications. Depatment of Biotechnology. **Doctoral Thesis**. Lund University.

Ferrara, M.A., Bon, E.P.S., and Neto, J.S.A. 2002. Use of Steam Explosion Liquor from Sugar Cane Bagasse for Lignin Peroxidase Production by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied Biochemistry and Biotechnology** Vol. 98-100.

Gadd, G.M. 1993. **Interaction of Fungi with Toxic Metals**. New Phytol 124:25-60

Galhaup, C. and Haltrich, D. 2001. Enhanced Formation of Laccase Activity by the White-rot Fungus *Trametes pubescens* in the Presence of Copper. **Applied Microbiology and Biotechnology** 56:225-32.

Garg, D. and Kaur, D.M.2013. Extraction, Purification and Characterization of Enzyme Amylase from *Bacillus amyloliquefaciens*. **Proceeding of 2<sup>nd</sup> International Conference on Emerging Trends in Engineering and Management, ICETEM**.

Gianfreda, L., Xu, F., and Bollag, J.1999. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. **Bioremediation Journal** 3: 1-25.

Ginting, A.R., Herlina, N. dan Tyasmoro, S.Y. 2013. Studi Pertumbuhan dan Produksi Fungi Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) pada Media Tumbuh Gergaji Kayu Sengon dan Bagas Tebu. **Jurnal Produksi Tanaman** Vol. 2 No.2.

Global Biodiversity Information Facility. 2015. *Gliomastix* sp. **OY17407**.<<http://www.gbif.org/species/106396316/classification>> [2 Maret 2015].

Goring, D.A. 1977. **In Cellulose Chemistry and Technology**. J.C. Arthur, editor. P.273. Washington: American Chemical Society.



Guimarães, L.H.S. 2012. **Carbohydrates from Biomass: Source and Transformation by Microbial Enzymes**. Intech.

Hakobyan, L., Gabrielyan, L., and Trchounian, A. 2012. Yeast Extract as an Effective Nitrogen Source Stimulating Cell Growth and Enhancing Hydrogen Photoproduction by *Rhodobacter sphaeroides* Strain from Mineral Springs. **International Journal of Hydrogen Energy** 37. P. 6519-6526.

Hartikainen, E.S., Hataka, A. and Kahkonen, M.A. 2013. Impact of Cadmium, Chromium, Cobalt, Lithium and Manganese to the Growth of Fungi and Production of Enzymes. **Expert Opinion on Environmental Biology** 2:3.

Harvey, P.J., Gilardi, G.F., Goble, M.L. and Palmer, J.M. 1993. Charge Transfer Reactions and Feedback Control of Lignin Peroxidase by Phenolic Compounds: Significance in Lignin Degradation. **Journal of Biotechnology** 30:57-69.

Hatakka, A. 2001. **Biodegradation of Lignin**. Finlandia: University of Helsinki, Viikki Biocenter, Department of Applied Chemistry and Microbiology.

Hattaka, A. and Hammel, K.E. 2010. **Fungal Biodegradation of Lignocelluloses**. Industrial Application, 2<sup>nd</sup> Edition. The Mycota X. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Hawksworth, D.L. Sutton, B.C. and Ainsworth, G.C. 1983. **Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi**, 7<sup>th</sup> edition. New UK : International Mycological Institute.

Herliyana, E.N., Ai, R. dan Isroi. 2011. *Pretreatment dengan Phanerochaete chrysosporium* dalam Hidrolisis Asam Encer



Sludge Kertas. **Jurnal Silvikultur Tropika** Vol. 02 No. 03 Hal. 187-193.

Hermiati, E., Mangunwidjaja, D., Sunarti, T.C., Suparno, O. dan Prasetya, B. 2010. Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu untuk Produksi Bioetanol. **Jurnal Litbang Pertanian**, 29(4).

Hofrichter, M. 2002. Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, 30:454-466.

Hossain, Sk.M. and Anantharaman, N. 2006. Activity Enhancement of Ligninolytic Enzymes of *Trametes versicolor* with Bagasse Powder. **African Journal of Biotechnology** Vol. 5 (1), pp. 180-194. India: Department of Chemical Engineering.

Howard, R.L., Abotsi, E., Jansen-van-Rensburg, E.L. and Howard, S. 2003. Lignocellulose Biotechnology: Issues of Bioconversion and Enzyme Production. **African Journal Biotechnology** 2(12): 602- 619.

Hughes, M.N. and Poole, R.K. 1991. Metal Speciation and Microbial Growth – The Hard and Soft Fact. **Journal of Gen Microbial** 137:725-34.

Ilmi, I.M. dan Kuswyasari, N.D. 2013. Aktivitas Enzim Lignin Peroksida oleh *Gliomastix* sp. T3.7 pada Limbah Bonggol Jagung dengan berbagai pH dan Suhu. **Jurnal Sains dan Seni Pomits** Vol.2, No.1, 2337-3520.

Ismayana, A. Indrasti, N.S., Suprihatin, Maddu, A. dan Fredy, A. 2012. Faktor Rasio C/N Awal dan Laju Aerasi pada Proses *Co-Composting* Bagasse dan Blotong. **Jurnal Teknologi Industri Pertanian** Vol 22, No. 3: 173-179.

Kanmani, P., Karuppasamy, P., Pothraj, C. and Arul, V. 2009. Studies on Lignocellulose Biodegradation of Coir Waste in Solid State Fermentation using *Phanerocheate chrysosporium* and *Rhizopus stolonifer*. **African Journal of Biotechnology** Vol. 8(24), pp. 6880-6887.

Kavanagh, K. 2005. **Fungi: Biology and Applications**. USA: John Wiley & Sons, Ltd

Kavanagh, K. 2011. **Fungi: Biology and Applications 2<sup>th</sup> edition**. USA: John Wiley & Sons, Ltd.

Kishi, K., Wariishi, H., Marquez, L., Dunford, H.B. and Gold, M.H. 1994. Mechanism of Manganese Peroxidase Compound II Reduction. Effect of Organic Acid Chelators and pH. **Biochemistry**, 33:8694-8701.

Kuhad, R.C. and Singh, A. 1993. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Review Biotechnology** 13, 151-172.

Kumar, S., Arya, D., Malhotra, A., Kumar, S. and Kumar, B. 2013. Biodegradation of Dual Phenolic Substrates in Stimulated Wastewater by *Gliomastix indicus* MTCC 3869. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, 1:865-874.

Langvad, F. 1999. A Rapid and Efficient Method for Growth Measurement of Filamentous Fungi. **Journal of Microbiological Methods** 37. 97-100.

Lebrun, J.D., Lamy, I., and Mougin, C. 2011. Favouring the Bioavailability of Zn and Cu to Enhance the Production of Lignin-modifying Enzymes in *Trametes versicolor* Culture. **Bioresource Technology**, 102,3103-3109.

Lechat, C., Farr, D.F., Hirooka, Y., Minnis, A.M. and Rossman, A.Y. 2010. A New of *Hydropisphaera*, *H.bambusicola*, is the Sexual State of *Gliomastix fusigera*. **Mycotaxon** Vol 111:95-102.

Lorenzo, M., Moldes, D. and Sanroman, A. 2006. Effect of Heavy Metals on the Production of several Laccase Isoenzymes by *Trametes versicolor* and on their Ability to Decolourise Dyes. **Chemosphere** 63, 912–917.

Lorian, V. 2005. **Antibiotics in Laboratory Medicine Fifth Edition**. USA: Lippincott Williams & Wilkins.

Lozovoya V.V., Lygin, A.V., Zernova, O. V., Li, S. and Widholm, J.M. 2006. Lignin Degradation by *Fusarium solani* f. sp. *Glycines*. **Plant Disease**. 9(1): 77-82.

Madhavi, V. and Lele, S.S. 2009. Laccase: Properties and Applications. **Bioresource** 4(4).

Martinez, A.T., Speranza, M., Ruiz-Duenas, F.J., Ferreira, P., Camarero, S., Guillen, F., Martinez, M.J., Guitierrez, A. and del Rio, J.C. 2005. Biodegradation of Lignocellulosics: Microbial, Chemical, and Enzymatic Aspect of the Fungal Attack of Lignin. **International Microbiology** 8:195-204.

Maryanty, Y. Pristianti, H., dan Ruliawati, P. 2010. Produksi Crude Lipase dari *Aspergillus niger* pada Substrat Ongok menggunakan Metode Fermentasi Fasa Padat. **Seminar Rekayasa Kimia dan Proses**.

McHargue, J.S. and Calfee. 1931. **Effect of Manganese, Copper and Zinc on the Growth of Yeast**. Department of Chemistry. Kentucky Agricultural Experiment Station.

Melgar, G.Z., de Assis, F.V.S., da Rocha, L.C., Fanti, S.C., Sette, L.D., and Porto, A.L.M. 2013. Growth Curves of Filamentous Fungi for Utilization in Biocatalytic Reduction of Cyclohexanones. **Global Journal of Science Frontier Research Chemistry** 13.

Mester, T., Jong, E. and Field, J.A 1995. Manganese Regulation of Veratryl Alcohol in White Rot Fungi and Its' Indirect on Lignin Peroxidase. **Applied and Environmental Microbiology** Vol.61.No.5.

Monties, B. and Fukushima, K. 2001. Occurrence, Function, and Biosynthesis of Lignins. In: Steinbüchel A., Hofrichter M, editors. **Biopolymers**. Vol. 1 Lignin, humic substances, and coal. p. 1–64. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

Moreira, M. T., Vlacava, C., and Vidal, G. 2004. Fed-batch Decolorization of Poly R-478 by *Trametes versicolor*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 47(2): 179-183.

Morris, A.J., Byrne, T.C. and Madden, J.F., and Reller, L.B. 1996. Duration of Incubation of Fungal Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**,p:1583-1585.

Mougin, C., Kollmann, A. and Jolival, C. 2002. Enhanced Production of Laccases by the Fungus *Trametes versicolor* by the Addition of Xenobiotics. **Biotechnology Letters** 24,139–142.

Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berteà, C. and Maffei, M. 2002. An Ascomycetous Endophyte Isolated from *Mentha piperita* L. Biological Features and Molecular Studies. **Mycologia** 94: 28–39.



Mueller, G.M., Bills, G.F., and Foster, M.S. 2004. **Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods**. London: Elsevier Academic Press.

Nagalakshmi, S., Subrahm, A. and Ravikanth, G. 2003. Studies on the Reduction of Conventional Organic Pollutants from Paper and Pulp Effluent Using *Gliomastix indicus*. **Indian Journal Environment Protection** 23: 785-787.

Niladevi, K.N. 2009. **Ligninolytic Enzymes. Biotechnology Division**. Trivandum, India: National Institute for Interdisciplinary Science and Technology (CSIR).

Nilson, T., Daniel, G., Kirk, T.K. and Obst, J.R. 1989. Chemistry and Microscopy of Wood Decay by Some Higher Ascomycetes. **Holforschung** Vol.43:11-18.

Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P. and Soccol, V.T. 2000. Biotechnological Potential of Agro-industrial Residues, I: Sugarcane Bagasse. **Journal of Bioresource Technology** 74(1):69-80.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B., and Sannia, G. 2000. Copper Induction of Laccase Isoenzymes in the Ligninolytic Fungus *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**.

Parani, K. and Eyini, M. 2012. Production of Ligninolytic Enzymes during Solid State Fermentation of Coffe Pulp by Selected Fungi. **Science Research Reporter** 2(3):202-209.

Patrick, F., Mtui, G., Mshandete, A.M., and Kivaisi, A. 2011. Optimization of Laccase and Manganese Peroxidase Production in Submerged Culture of *Pleurotus sajor-caju*. **African Journal of Biotechnology** Vol.10(50).

Perez, J. and Jeffries, T.W. 1992. Roles of Manganese and Organic Acid Chelator in Regulating Lignin Degradation and Biosynthesis of Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology** 21:323-33.

Perez, J., Munoz-Dorado, de la Rubia, T. and Martinez, J. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemicellulose and Lignin: An Overview. **International Microbiology**,5:53-63.

Piscitelli, A., Giardina, P., Lettera, V., Pezzela, C., Sannia, G., and Faraco, V. 2011. Induction and Transcriptional Regulation of Laccase in Fungi. **Current Genomics**. 12. 104-112.

Rohmah, Y.M., Kuswytasari, N.D. dan Shovitri, M. 2011. **Studi Isolat Kapang Tanah dari Wonorejo Surabaya dalam Mendegradasi Lignin**. Surabaya : Biologi FMIPA ITS.

Rosmeika, Sutiarso, L. dan Suratmo, B. 2009. Pengkajian Daur Hidup Ampas Tebu di Pabrik Gula Madukismo, Yogyakarta menggunakan Metode Life Cycle Assessment (LCA). **Jurnal Enjiniring Pertanian**. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.

Rutherford, J.C., and Bird, A.J. 2004. Metal-Responsive Transcription Factors that Regulate Iron, Zinc, and Copper Homeostasis in Eukaryotic Cells. **American Society for Microbiology** Vol.3, No.1.

Samuels, G.J. and Selfert, K.A. 1995. The Impact of Molecular Characters on Systematic of Filamentouse scomycetes. **Annual Review Phytopathology** 33:37-67.

Sanchez, C. 2009. Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi. **Biotechnology Advance** 27(2), 185-194.

Scopes, R.K. 2002. **Enzyme Activity and Assay**. Australia: Macmilan Publisher Ltd.

Shary, S., Ralph, S.A. and Hammel, K.E. 2007. New Insight into the Ligninolytic Capability of A Wood Decay Ascomycete. **Applied and Environmental Microbiology**. P.6691-6694.

Singh, H. 2006. **Mycoremediation**. America: John Wiley & Sons, Inc. p:358-375.

Singh, R.K., Shashi, K., Surendra, K. and Arinjay, K. 2008. Biodegradation Kinetic Studies for the Removal of p-cresol from Wastewater Using *Gliomastix indicus* MTCC 3869. **Biochemical Engineering Journal** 40 : 293-303.

Singhal, V. and Rathore, V.S. 2001. Effects of  $Zn^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  on Growth, Lignin Degradation and Ligninolytic Enzymes in *Phaneorochaete chrysosporium*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, 17:235-40.

Singhania, R.R., Sukumaran, R.K., Pillai, A., Prema, P., Szakacs, G. and Pandey, A. 2006. Solid-state Fermentation of Lignocellulosic Substrates for Cellulose Production by *Trichoderma reesei* NRRL 11460. **Indian Journal of Biotechnology** Vol 5, pp:332-336.

Sridevi, B. and Charya, M.A.S. 2011. Isolation, Identification and Screening of Potential Cellulase-free Xylanase Producing Fungi. **African Journal of Biotechnology** Vol. 10(22),pp. 4624-4630.



Stajic, M, Persky, L., Hadar, Y., Friesem, D., Duletic-Lausevic, S., Wasser, S.P., and Nevo, E. 2006. Effect of Copper and Manganese Ions on Activities of Laccase and Peroxidase in three *Pleurotus* species Grown on Agriculture Wastes. **Applied Biochemistry and Biotechnology** 128(1).

Steffen, K.T. 2003. Degradation of Recalcitrant Biopolymers and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Litter-decomposing Basidiomycetous Fungi. **Dissertation**. Helsinki: Division of Microbiology Department of Applied Chemistry and Microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki.

Taylor, G.S. and Parkinson, D. 1965. Studies of Fungi in the Root Region (IV) Fungi Associated with the Roots of *Phaseolus vulgaris* L., **Plant and Soil**. 22:1-20

Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D. 2003. **Wastewater Engineering: Treatment and Reuse**, fourth edition. New Delhi : Metcalf & Eddy Inc., Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.

Tekere, M, Zvaunya, R., and Read, J. 2001. Ligninolytic Enzymes Production in Selected Sub-tropical White Rot Fungi under Different Culture Conditions. **J. Basic Microbiol.** 41: 115-12

Tuomela, M. 2002. Degradation of Lignin and other 14 C-labeled Compounds in Compost and Soil with an Emphasis on White-rot Fungi. **Dissertation**. Department of Applied Chem. And Microbiology. University of Helsinki

UI-Haq, Ikram, Javed, M.M. and Khan, T.S. 2006. Sugarcane Bagasse Pretreatment: An Attempt to Enhance the Production Potential of Celluloses by *Humicola insolens* TAS-13. **Biochemistry** 18(2):83-88.



Urek, R.O. and Pazarlioglu, N.K. 2007. Enhanced Production of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. **An International Journal: Brazilian Archives of Biology and Technology** Vol.50. pp: 913-920.

Usha, K.Y., Pravee, P., and Reddy, R. 2014. Enhanced Production of Ligninolytic Enzymes by a Mushroom *Stereum ostrea*. **Biotechnology Research International**.

Wei, Y. and Dai, Y. 2004. Ecological Function of Wood-inhabiting Fungi in Forest Ecosystem. **Ying Yong Sheng Tai Xue Bao**, October 15(10):1935-8.

Winkelmaan, G. and Winge, D.R. 1994. **Metal Ions in Fungi**. New York: Marcel Dekker, Inc.

Widiastuti, H., Siswanto dan Suharyanto. 2007. Optimasi Pertumbuhan dan Aktivitas Enzim Ligninolitik *Omphalina* sp. dan *Pleurotus ostreatus* pada Fermentasi Padat. **Menara Perkebunan** 75(2):93-105.

Widiastuti, H. dan Tripanji. 2008. Pola Aktivitas Enzim Ligninolitik *Pleurotus ostreatus* pada Limbah *Sludge* Pabrik Kertas. **Jurnal Menara Perkebunan** 76(1), 47-60. Bogor: Balai Penelitian Bioteknologi Perkebunan Indonesia.

Wong, D.W.S. 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. **Applied and Biochemistry Biotechnology** 157:174-209. USA: Humana Press.

Yasmeen, Q., Asgher, M., Sheikh, M.A. and Nawaz, H. 2013. Optimization of Ligninolytic Enzymes Production through Response Surface Methodology. **BioResources** 8(1), 944-968.

Yousef, A.E. and Carlstrom, C. 2003. **Food Microbiology: A Laboratory Manual**. United State of America: A Wiley-Interscience publications.

Yuwono, T., Rolanda, E., Widjaja, A. dan Soeprijanto. 2012. Fermentasi Hidrolisat Enzimatik Bagasse Tebu menjadi Hidrogen. **Jurnal Teknik Pomits** Vol. 1, No. 1.

Zhang, H., Hong, Y.Z., Xiao, Y.Z., Yuan, J., Tu, X.M. and Zhang, X.Q. 2006. Efficient Production of Laccase by *Trametes* sp. AH28-2 in Cocultivation with a *Trichoderma* strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**,73:89-94.

Zhao,D., Zhang, X., Cui, D., and Zhao, M. 2012. **Characterisation of a Novel White Laccase from the Deuteromycete Fungus Myrothecium verrucaria NF-05 and Its Decolourisation of Dyes.**

Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., and Riet, K.V. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. **Applied and Environmental Microbiology** Vol. 56, No. 6. P. 1875-1881.

## LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel Biomassa Kurva Pertumbuhan.

Hari ke-	Biomassa miselium (gram)		
	<i>Mycelia sterilia</i> sp.	<i>Gliomastix</i> sp.	Konsorsim
1	0.02	0.01	0
2	0.02	0.01	0.01
3	0.02	0.01	0.02
4	0.02	0.01	0.02
5	0.03	0.03	0.01
6	0.03	0.04	0.03
7	0.04	0.03	0.04
8	0.04	0.05	0.04
9	0.02	0.04	0.02
10	0.01	0.04	0.04
11	0.02	0.04	0.05
12	0.01	0.04	0.01
13	0	0.03	0.03
14	0	0.02	0.01

Lampiran 2. Pertumbuhan Miselium *Mycelia sterilia* sp.

(a)



(b)



(c)

Pertumbuhan Miselium *Mycelia sterilia* sp. (a) Penambahan logam  $\text{Cu}^{2+}$ , (b) Penambahan Logam  $\text{Zn}^{2+}$ , (c) Penambahan logam  $\text{Mn}^{2+}$ .



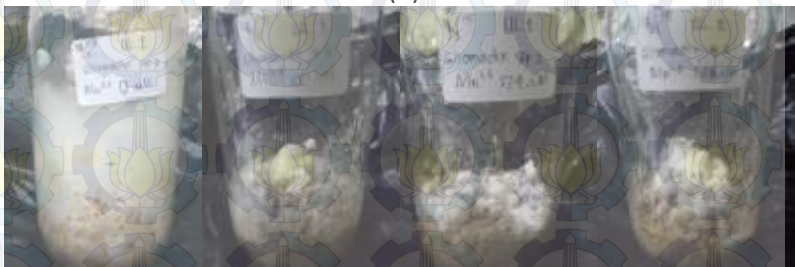
Lampiran 3. Pertumbuhan Miselium *Gliomastix* sp.



(a)



(b)



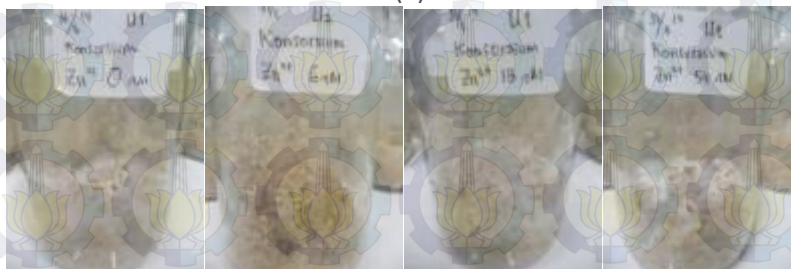
(c)

Pertumbuhan Miselium *Gliomastix* sp. (a) Penambahan logam  $\text{Cu}^{2+}$ , (b) Penambahan Logam  $\text{Zn}^{2+}$ , (c) Penambahan logam  $\text{Mn}^{2+}$ .

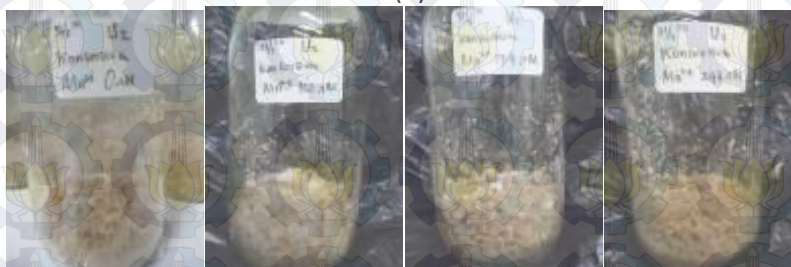
## Lampiran 4. Pertumbuhan Miselium Konsorsium



(a)



(b)



(c)

Pertumbuhan Miselium Konsorsium. (a) Penambahan logam  $\text{Cu}^{2+}$ , (b) Penambahan Logam  $\text{Zn}^{2+}$ , (c) Penambahan logam  $\text{Mn}^{2+}$ .

### Lampiran 5. Pertumbuhan kontrol (tanpa isolat)



(a)



(b)



(c)

Medium Optimasi Tanpa Isolat (a) Penambahan logam  $\text{Cu}^{2+}$ , (b) Penambahan Logam  $\text{Zn}^{2+}$ , (c) Penambahan logam  $\text{Mn}^{2+}$ .



## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Mojokerto, 15 September 1993 sebagai anak kedua dari tiga bersaudara. Pada tahun 2011 penulis lulus dari Madrasah Aliyah Unggulan Amanatul Ummah Surabaya program MBI (Madrasah Bertaraf Internasional) dan pada tahun yang sama penulis lolos dalam seleksi masuk Perguruan Tinggi Negeri melalui jalur SNMPTN di Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya dengan jurusan Biologi.

Selama kuliah di Institut Teknologi Sepuluh Nopember penulis pernah bergabung dalam organisasi HIMABITS (Himpunan Mahasiswa Biologi ITS) sebagai ketua divisi Advokasi Departemen Kesejahteraan Mahasiswa dan FKIQ (Forum Kajian Islam Al-Qurani) sebagai Sekretaris Departemen Hubungan Luar. Selain itu, penulis juga aktif dalam kegiatan kepanitiaan baik dalam lingkup jurusan, fakultas maupun institut seperti dalam kegiatan pelatihan guru SMA, IBOC (*International Biology Conference*), INTERN FMIPA, INTERVAL ITS. Riwayat pelatihan yang pernah diikuti meliputi *Emotion Spiritual Quotion*, *Achievement Motivation Training*, Pra LKMM-TD, *Islamic Motivation Training*, LKMM-TD HIMABITS dan pelatihan jurnalistik. Di antara aktivitas studi, penulis juga pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah Struktur Perkembangan Tumbuhan II di Jurusan Biologi ITS dan menjadi guru privat mata pelajaran IPA. Selain itu penulis juga pernah melakukan penelitian tentang “Pengaruh Naungan Plastik dan Fungisida terhadap Pertumbuhan serta Perkembangan Hama Penyakit Tanaman Tomat (*Lycopersicon esculentum*)” di BPTP Jawa Timur.